

Verónica Sofia Oliveira Simões

Licenciada em Química Aplicada



Efeito do aquecimento e acidificação da água do mar na qualidade nutricional do linguado (*Solea senegalensis*)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Patrícia Anacleto, Investigadora, Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) - Laboratório Marítimo da Guia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.)

Co-orientador: Doutora Maria Paula Duarte, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada com Agregação, FCT-UNL

Arguente: Doutora Helena Isabel Costa de Oliveira, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Vogal: Doutora Patrícia Anacleto, Investigadora, Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) - Laboratório Marítimo da Guia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.)



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2019



Verónica Sofia Oliveira Simões

Licenciada em Química Aplicada

Efeito do aquecimento e acidificação da água do mar na qualidade nutricional do linguado (*Solea senegalensis*)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Patrícia Anacleto, Investigadora, Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) - Laboratório Marítimo da Guia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.)

Co-orientador: Maria Paula Duarte, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada com Agregação, FCT-UNL

Arguente: Doutora Helena Isabel Costa de Oliveira, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Vogal: Doutora Patrícia Anacleto, Investigadora, Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) - Laboratório Marítimo da Guia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.)



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2019

Efeito do aquecimento e acidificação da água do mar na qualidade nutricional do linguado (*Solea senegalensis*)

Copyright © Verónica Sofia Oliveira Simões, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Let food be thy medicine and medicine be thy food."

Hippocrates

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, Doutora Patrícia Anacleto, por confiar e aceitar a minha participação no seu projeto. Obrigada pela atenção e esforço dedicado ao longo do tempo em que trabalhamos juntas.

Igualmente importante é o meu agradecimento à Professora Doutora Paula Duarte pela disponibilidade, ajuda e compreensão demonstradas nos momentos de maior pressão e desespero, no decorrer desta dissertação.

Um obrigado do tamanho do mundo à Mestre Sandra Rebocho por todo o tempo, ajuda, paciência, confiança e amizade que demonstrou desde o início desta aventura. A melhor frase para descrever esta experiência contigo seria sem dúvida “Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

À Doutora Ana Maulvault por me ouvir, tirar peso dos meus ombros, e de certa forma aliviar a tensão e gravidade que punha sobre os desafios que se iam apresentando.

Ao Doutor António Marques, e ao seu grupo de investigação onde estive inserida, obrigado pela confiança.

Ao Rúben Ferreira pelo carinho, dedicação e empenho demonstrados durante as alturas de maior *stress* e mau feitio.

Ao António Simões, Rosa Oliveira, Analdete Marvão, Ester Moreira, Vanessa Esteves, Bárbara Ferreira, Diana Pereira, Sónia Costa e Mayara Aued pelas palavras de motivação, encorajamento, por fazerem ver que tudo é fazível, e, que, os maiores e mais importantes desafios da vida ainda estão por vir e que felizmente não hei-de estar sozinha a enfrentá-los.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto FISHBUDGET - Effects of climate change on marine fish energy budgets (PTDC/BIA-BMA/28630/2017).

Este estudo também foi beneficiado pelo programa estratégico do MARE, financiado pela FCT (MARE-UID/MAR/04292/2019).

À empresa Sparos Lda pelo fornecimento da ração dos peixes e à Estação Piloto de Piscicultura em Olhão do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (EPPO-IPMA) pelo fornecimento dos juvenis de peixes usados na experiência.

Resumo

As alterações climáticas podem causar um grande impacto na qualidade e segurança das espécies marinhas usadas na alimentação humana, o que pode representar perigos para a saúde pública. A presente tese teve como objetivo estudar os efeitos, isoladamente ou em combinação, do aquecimento ($\Delta T = +4$ °C) e da acidificação ($\Delta pCO_2 \sim +500$ μatm equivalente a $\Delta pH = -0,3$ unidades) dos oceanos na condição animal e qualidade nutricional no músculo do linguado (*Solea senegalensis*) durante 61 dias.

A temperatura atuando isoladamente contribuiu para o aumento significativo do peso dos animais, dos teores de humidade, ácidos gordos saturados (SFA, principalmente C16:0 e C18:0) e zinco, bem como dos índices de condição de Fulton, hepatossomático (HSI), aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), no entanto levou à diminuição dos índices visceral (VSI), taxa de crescimento relativa (TCR) e hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (h/H), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Por outro lado, a acidificação atuando sozinha contribuiu para a diminuição significativa da taxa de crescimento relativa (TCR) e dos teores de alguns MUFA e PUFA, tendo levado ao aumento dos SFA. A combinação dos dois fatores de *stress* resultou no aumento significativo apenas do peso e da TCR, e na diminuição do HSI, teor de gordura e MUFA. Nos três cenários de exposição às alterações climáticas ocorreu uma diminuição significativa dos teores de EPA e DHA, $\Sigma\omega 3$, $\Sigma\omega 6$, $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$ e do índice h/H, ao passo que os índices IA e IT aumentaram. Dado que um dos principais atributos nutricionais do pescado é o fato deste ser uma fonte importante de ácidos gordos $\omega 3$ (em particular de EPA e DHA), os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o aquecimento e acidificação afetaram negativamente a qualidade nutricional do linguado, podendo representar riscos para a saúde humana. Este estudo realça a importância de efetuar uma análise de risco-benefício do consumo de pescado num contexto de alterações climáticas.

Palavras-chave: *Solea senegalensis*, alterações climáticas, aquecimento, acidificação, qualidade nutricional, ácidos gordos, minerais.

Abstract

Climate change can cause major impacts on the quality and safety of marine species used in human consumption, which may represent dangers to public health. The present thesis aimed to study the effects, alone or in combination, of ocean warming ($\Delta T = +4$ °C) and acidification ($\Delta pCO_2 \sim +500$ μatm , equivalent to $\Delta pH = -0.3$ units) on the animal condition and nutritional quality in the muscle of sole (*Solea senegalensis*) during 61 days.

Warming acting alone contributed to the significant increase of animal weight, moisture content, ash, saturated fatty acids (SFA, mainly C16:0 and C18:0), zinc, Fulton's K condition factor and hepatosomatic (HSI), atherogenicity (IA) and thrombogenicity (IT) indices, however led to a significant decrease in visceral indices (VSI), relative growth rate (TCR) and hypocholesterolemic/hypercholesterolemic (h/H), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). On the other hand, acidification acting alone contributed to a significant decrease in TCR, the content of some MUFA and PUFA, leading to an increase of SFA. The combination of the two stress factors resulted only in a significant increase in weight and TCR, and in a significant decrease in HSI, fat content and MUFA. In the three climate change scenarios, there was a significant decrease in the EPA and DHA, $\Sigma\omega 3$, $\Sigma\omega 6$, $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$ and h/H index, while the IA and IT indices increased. Since one of the main nutritional attributes of fish is being an important source of $\omega 3$ fatty acids (in particular EPA and DHA), the results obtained in this study showed that the warming and acidification negatively affected the nutritional quality of sole and may pose risks to human health. This study highlights the importance to perform a risk-benefit analysis of fish consumption in a climate change context.

Keywords: *Solea senegalensis*, climate change, warming, acidification, nutritional quality, fatty acids, minerals.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS.....	1
1.1.1. AQUECIMENTO DOS OCEANOS.....	3
1.1.2. ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS.....	4
1.1.3. IMPACTOS DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS NA AQUACULTURA.....	7
1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E QUALIDADE NUTRICIONAL DO PESCADO	9
1.2.1. ÁGUA	10
1.2.2. PROTEÍNAS	10
1.2.3. LÍPIDOS.....	11
1.2.3.1. ÁCIDOS GORDOS.....	12
1.2.4. HIDRATOS DE CARBONO	13
1.2.5. VITAMINAS	14
1.2.6. MINERAIS	15
1.2.6.1. MACROELEMENTOS ESSENCIAIS.....	15
1.2.6.2. MICROELEMENTOS ESSENCIAIS.....	16
1.3. EFEITOS DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS NA QUALIDADE NUTRICIONAL DO PESCADO.....	17
1.4. MODELO BIOLÓGICO: LINGUADO (<i>SOLEA SENEGALENSIS</i>).....	19
1.4.1. IMPORTÂNCIA EM AQUACULTURA	19
1.5. OBJETIVOS	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
2.1.1. ACLIMATAÇÃO DOS ORGANISMOS EM ESTUDO.....	23
2.1.2. EXPOSIÇÃO AOS CENÁRIOS DE AQUECIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS.....	24

2.2.	METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	26
2.2.1.	ALCALINIDADE	26
2.2.2.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA	27
2.2.2.1.	HUMIDADE	27
2.2.2.2.	CINZA.....	28
2.2.2.3.	PROTEÍNA BRUTA.....	28
2.2.2.4.	GORDURA LIVRE TOTAL	30
2.2.2.5.	GLICOGÉNIO	31
2.2.2.6.	ENERGIA.....	32
2.2.3.	PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	33
2.2.4.	TEOR DE MINERAIS.....	35
2.2.4.1.	QUANTIFICAÇÃO DE MACRO (K, NA E MG) E MICROELEMENTOS (ZN, FE, CU E MN) ESSENCIAIS.....	35
2.2.4.2.	QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO (P).....	38
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
3.	RESULTADOS	41
3.1.	DADOS BIOMÉTRICOS E CONDIÇÃO FISIOLÓGICA	41
3.2.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA	42
3.3.	PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.....	43
3.4.	MINERAIS	48
3.5.	INFLUÊNCIA DO AQUECIMENTO E ACIDIFICAÇÃO NO VALOR NUTRICIONAL DO LINGUADO	49
4.	DISCUSSÃO	55
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
	ANEXOS.....	79

Índice de Figuras

FIGURA 1.1. ALTERAÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DOS OCEANOS PROVOCADAS POR ATIVIDADES DE ORIGEM ANTROPOGÉNICA.	2
FIGURA 1.2. ALTERAÇÕES DE TEMPERATURA MÉDIA DA SUPERFÍCIE DA TERRA ENTRE (A) 1901-2012 E (B) PROJEÇÕES FEITAS SEGUNDO O CENÁRIO RCP 8.5 PARA 2081-2100.	3
FIGURA 1.3. CICLO DO CARBONO.....	5
FIGURA 1.4. PROJEÇÃO DAS ALTERAÇÕES PREVISTAS DO PH DO OCEANO EM 2100.	5
FIGURA 1.5. REAÇÕES QUÍMICAS PROVOCADAS PELO AUMENTO DE $[CO_2]_{ATM}$ DISSOLVIDO NOS OCEANOS.	6
FIGURA 1.6. CONSUMO DE PESCADO <i>PER CAPITA</i> (2012; KG/PESSOA/ ANO) E SIMULAÇÃO PARA OS ANOS DE 2030 E 2050 A NÍVEL MUNDIAL (EIXO Y DA ESQUERDA) E A NÍVEL REGIONAL (EIXO Y DA DIREITA).	9
FIGURA 1.7. <i>SOLEA SENEGALENSIS</i>	19
FIGURA 1.8. EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO (TONELADAS) DO LINGUADO <i>SOLEA SENEGALENSIS</i> EM AQUACULTURA NA EUROPA, ENTRE 2005-2012.	20
FIGURA 2.1. DESENHO EXPERIMENTAL.	25
FIGURA 2.2. ESPETROFOTÓMETRO (UV-1800, SHIMADZU, JAPÃO).	26
FIGURA 2.3. UNIDADE DESTILADORA (KJELTEC SYSTEM 1002 DISTILLING UNIT TECATOR).	29
FIGURA 2.4. APARELHO DE <i>SOXHLET</i> (P SELECTA, ESPANHA).	31
FIGURA 2.5. ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÓMICA DE CHAMA (VARIAN, SPECTR AA 55B).	36
FIGURA 3.1. TEOR DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS SATURADOS (SFA; MG/100 G DE PESO SECO) NO MÚSCULO DOS LINGUADOS APÓS 61 DIAS DE EXPOSIÇÃO A CADA UM DOS TRATAMENTOS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO; N=3): A) TOTAL SFA (Σ SFA); B) ÁCIDO MIRÍSTICO (MA; C14:0); C) ÁCIDO PALMÍTICO (PA; C16:0); E D) ÁCIDO ESTEÁRICO (SA; C18:0).	44
FIGURA 3.2. TEOR DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS MONOINSATURADOS (MUFA; MG/100G DE PESO SECO) NO MÚSCULO DOS LINGUADOS APÓS 61 DIAS DE EXPOSIÇÃO A CADA UM DOS TRATAMENTOS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO; N=3). A) TOTAL MUFA (Σ MUFA); B) ÁCIDO PALMITOLEICO (PA; C16:1 N-7); C) ÁCIDO OLEICO (AO; C18:1 N-9); D) ÁCIDO GADOLEICO (GA; C20:1 N-9); E) ÁCIDO ERÚCICO (EA; C22:1 N-9).	45
FIGURA 3.3. TEOR DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS (PUFA; MG/100G DE PESO SECO) NO MÚSCULO DOS LINGUADOS APÓS 61 DIAS DE EXPOSIÇÃO A CADA UM DOS TRATAMENTOS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO; N=3). A) TOTAL PUFA (Σ PUFA); B) ÁCIDO LINOLEICO (LA; C18:2 N-6); C) ÁCIDO A-LINOLÉNICO (ALA; C18:3 N-3); D) ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO (EPA; C20:5 N-3); E) ÁCIDO DOCOSAPENTAENÓICO (EA; C22:6 N-3).	46
FIGURA 3.4. SOMATÓRIO DOS ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA 3 E ÓMEGA 6, (CONTROLO, ACIDIFICAÇÃO, AQUECIMENTO, ACIDIFICAÇÃO+AQUECIMENTO; MÉDIA ± DESVIO PADRÃO; MG/100 G EM PESO SECO). A) $\Sigma\Omega$ 3-SOMATÓRIO DOS ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA 3; B) $\Sigma\Omega$ 6-SOMATÓRIO DOS ÁCIDOS GORDOS ÓMEGA 6.....	47

Índice de Tabelas

TABELA 1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PESCADO PRODUZIDAS EM AQUACULTURA.	10
TABELA 1.2. VALOR NUTRICIONAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PESCADO PRODUZIDAS EM AQUACULTURA, EM PESO HÚMIDO.	12
TABELA 1.3. CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE PESCADO PRODUZIDAS EM AQUACULTURA, EM PESO HÚMIDO.	14
TABELA 1.4. TEOR DE MINERAIS ENCONTRADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE PESCADO PRODUZIDAS EM AQUACULTURA, EM PESO HÚMIDO.	15
TABELA 2.1. PADRÕES UTILZADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO POTÁSSIO (K), SÓDIO (NA), MAGNÉSIO (MG), ZINCO (ZN), FERRO (FE), COBRE (CU) E MANGANÊS (MN).....	37
TABELA 2.2. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO PARA O ESPECTOFOTÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE CHAMA.	37
TABELA 3.1. PESO (G), COMPRIMENTO TOTAL (CM), ÍNDICES HEPATOSSOMÁTICO (HSI, %), VISCERAL (VSI, %) E DE FULTON (F), TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVA (TCR; %) E TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO EM TERMOS DE PROTEÍNA (TCEP; %/DIA) DOS LINGUADOS JUVENIS NO INÍCIO E FINAL DA EXPERIÊNCIA (T ₀ E T ₆₁ RESPETIVAMENTE) PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS.	42
TABELA 3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA (%) E ENERGIA (KJ/G) DOS LINGUADOS JUVENIS NO INÍCIO E FINAL DA EXPERIÊNCIA (T ₀ E T ₆₁ RESPETIVAMENTE) PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS.	43
TABELA 3.3. VALORES DOS TEORES DE EPA+DHA E $\Sigma\Omega3/\Sigma\Omega6$ E DOS ÍNDICES NUTRICIONAIS OBTIDOS NO MÚSCULO DO LINGUADO APÓS 61 DIAS DE EXPOSIÇÃO A CADA UM DOS TRATAMENTOS: IA (ÍNDICE DE ATEROGENICIDADE), IT (ÍNDICE DE TROMBOGENICIDADE), H/H (RAZÃO HIPOCOLESTEROLÉMICO/HIPERCOLESTEROLÉMICO).....	48
TABELA 3.4. TEORES DE ELEMENTOS ESSENCIAIS (MG/KG) NO MÚSCULO DO LINGUADO <i>SOLEA SENEGALENSIS</i> , NO INÍCIO E NO FINAL DA EXPERIÊNCIA (T ₀ E T ₆₁ , RESPETIVAMENTE) PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS.....	49
TABELA 3.5. CONTRIBUIÇÃO NUTRICIONAL DO LINGUADO JUVENIL EM TERMOS DE ÁCIDOS GORDOS PARA ADULTOS (>18 ANOS) E CRIANÇAS (0-10 ANOS), ATRAVÉS DO CONSUMO DE UMA REFEIÇÃO DE 150 G DE MÚSCULO DE PEIXE	51
TABELA 3.6. CONTRIBUIÇÃO NUTRICIONAL DO LINGUADO JUVENIL EM TERMOS DE MACRO E MICROELEMENTOS ESSENCIAIS PARA ADULTOS (>18ANOS), ATRAVÉS DO CONSUMO DE UMA REFEIÇÃO DE 150 G DE MÚSCULO DE PEIXE.....	52
TABELA 3.7. CONTRIBUIÇÃO NUTRICIONAL DO LINGUADO JUVENIL EM TERMOS DE MACRO E MICROELEMENTOS ESSENCIAIS PARA CRIANÇAS (0-10ANOS), ATRAVÉS DO CONSUMO DE UMA REFEIÇÃO DE 150 G DE MÚSCULO DE PEIXE	53

Lista de Símbolos e Abreviaturas

%: Percentagem

λ : Comprimento de onda

°C: Grau Celsius

μatm : Micro atmosfera

μg : Micrograma

$\omega 3$: Ómega-3

$\omega 6$: Ómega-6

AHA: American Heart Association (Associação Americana do Coração)

ALA: Ácido Alfa-Linolénico

As: Arsénio

AT: Alcalinidade Total

ATP: Adenosina Trifosfato

BHT: Hidroxitolueno Butilado

Ca^{2+} : Ião cálcio

CaCO_3 : Carbonato de cálcio

CBO: Carência Bioquímica de Oxigénio

Cd: Cádmio

CH_4 : Metano

cm: Centímetro

CO_2 : Dióxido de carbono

CO_3^{2-} : Ião carbonato

CT: Carbono Total

Cu: Cobre

DAC: Doença Arterial Coronária

DDE: Dose Diária Estimada

DDR: Dose Diária Recomendada

DHA: Ácido Docosahexaenóico

EA: Ácido Erúcico

EFAs: Ácidos Gordos Essenciais

EPA: Ácido Eicosapentaenóico

EPPO-IPMA: Estação Piloto de Piscicultura de Olhão-Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Eu: Európio

FAME: Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FAs: Ácidos Gordos

Fe: Ferro

g: Grama

GA: Ácido Gadoleíco

GC: Cromatografia Gasosa

GEE: Gases de Efeito de Estufa

GC-FID: Cromatografia de Fase Gasosa com Detetor de Ionização de Chama

H⁺: Ião hidrogénio

H₂CO₃: Ácido carbónico

H₂O: Água

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HCO³⁻: Ião bicarbonato

Hg: Mercúrio

h/H: Índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico

HPLC-MS: Cromatografia Líquida de Alta Precisão-Espetrometria de Massa

HSI: Índice hepatossomático

HSPs: Proteínas de choque térmico

I: Intensidade

IA: Índice de Aterogenicidade

IPCC: Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas

IT: Índice de Trombogenicidade

K: Potássio

kg: Quilograma

LA: Ácido Linoléico

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LMG: Laboratório Marítimo da Guia

MA: Ácido Mirístico

MALDI-TOF: Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz-Analisador de Tempo-de-voo

MARE-FCUL: Centro de Ciências do Mar e do Ambiente-Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mg: Magnésio

mg: Miligrama

mm: Milímetro

Mn: Manganês

MUFA: Ácidos Gordos Monoinsaturados

N₂O: Óxido nitroso

Na: Sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₃: Amónia

NH₄⁺: Catião amónio

NH₄VO₃: Metavanadato de amónio

nm: Nanómetro

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

O₂: Oxigénio

OA: Ácido Oleico

OD: Oxigénio Dissolvido

ORBEA: Comité de Ética da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

P: Fósforo

P₂O₅: Pentóxido de fósforo

PA: Ácido Palmítico

Pb: Chumbo

pH: Potencial de hidrogénio

ppm: Partes por milhão

PUFA: Ácidos Gordos Polinsaturados

RAS: Sistema de Recirculação de Aquacultura

Rb: Rubídio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SA: Ácido Esteárico

Se: Selênio

SFA: Ácidos Gordos Saturados

TCR: Taxa de crescimento relativa

UV: Ultra-Violeta

VSI: Índice viscerossomático

Zn: Zinco



Introdução

1.1. Alterações Climáticas

Ao longo de milhares de anos têm-se registado alterações climáticas, manifestando-se na forma de variações de temperatura (*p.e.* era glacial) e na ocorrência de alguns fenómenos periódicos (*p.e.* tempestades, furacões, secas). No entanto, nos últimos 150 anos, o aparecimento destes fenómenos agravou-se, assim como a sua severidade. Intimamente ligado a esta observação está a evolução do comércio mundial, que levou ao desenvolvimento, progresso tecnológico e à criação de novas indústrias – Revolução Industrial (VijayaVenkataRaman et al., 2012). Desta forma, a exploração exaustiva dos recursos naturais, juntamente com a crescente produção e libertação de poluentes para o meio ambiente, como os gases de efeito de estufa (GEE; *p.e.* dióxido de carbono - CO₂, metano - CH₄ e óxido nitroso - N₂O) têm contribuído para uma das maiores preocupações ambientais da atualidade – os efeitos das alterações climáticas (Maulvault et al., 2018a; VijayaVenkataRaman et al., 2012). As alterações climáticas de origem antropogénica (*p.e.* queima de combustíveis fósseis, desflorestação contínua) são principalmente mediadas pelas emissões de GEE (predominantemente CO₂). Estas substâncias gasosas absorvem a radiação infravermelha evitando que esta seja libertada para o espaço (efeito de estufa), resultando no progressivo aquecimento do planeta (*i.e.* aquecimento global). Segundo o último relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2014), as emissões dos GEE atingiram níveis sem precedentes nos últimos 50 anos. Consequentemente, os elevados níveis de CO₂ e o aumento da temperatura média global resultam numa série de alterações físicas e químicas, tendo um forte impacto nos ecossistemas (Figura 1.1.; Anacleto et al., 2018; Berdal et al., 2001; Harley et al., 2006).

A maior parte da energia produzida na forma de calor é armazenada nos oceanos (cerca de 93%), o que tem resultado no aumento da temperatura média à superfície da água do mar (Anacleto et al., 2018; Maulvault et al., 2018b,c; Maulvault et al., 2019a). Projeções recentes indicam que, até ao final do século XXI, a temperatura média da superfície da Terra deverá aumentar entre 0,3 °C e 4,8 °C, com fortes impactos a nível regional (Anacleto et al., 2018; Bai et al., 2008; Berdal et al., 2001; Maulvault et al., 2019a). Como consequência do aquecimento global destaca-se a subida do nível médio da água do mar, originada pelo degelo dos glaciares e zonas polares. A alteração deste nível terá impacto nas zonas costeiras à escala mundial, estimando-se um aumento de cerca de 2 metros até ao final do ano 2100 (IPCC, 2014). Além

disso, têm ainda sido registadas alterações nos padrões de precipitação, mudanças das correntes e ventos, frequência e intensidade das tempestades, verificando-se um aumento durante o inverno (Pörtner et al., 2008). O aumento da temperatura também tem consequências acentuadas nos ciclos biogeoquímicos, na estratificação da coluna de água (*i.e.* formação de camadas de água com densidades diferentes), que causam alterações na salinidade da água do mar e diminuição do oxigénio disponível, uma vez que temperaturas mais elevadas reduzem a solubilidade do oxigénio na água, aumentando o número de zonas com baixas concentrações de oxigénio denominadas “dead zones” ou zonas de hipóxia (Schiedek et al., 2007; VijayaVenkataRaman et al., 2012). Estima-se que a intensificação da estratificação resulte numa perda global de 85% do oxigénio nos oceanos, devido à redução da recirculação das águas (FAO, 2018a). Os níveis elevados de CO₂ também contribuem para a destruição contínua da camada de ozono, o que leva a um aumento da radiação UV na superfície terrestre (Caldeira e Wickett, 2005; Harley et al., 2006).

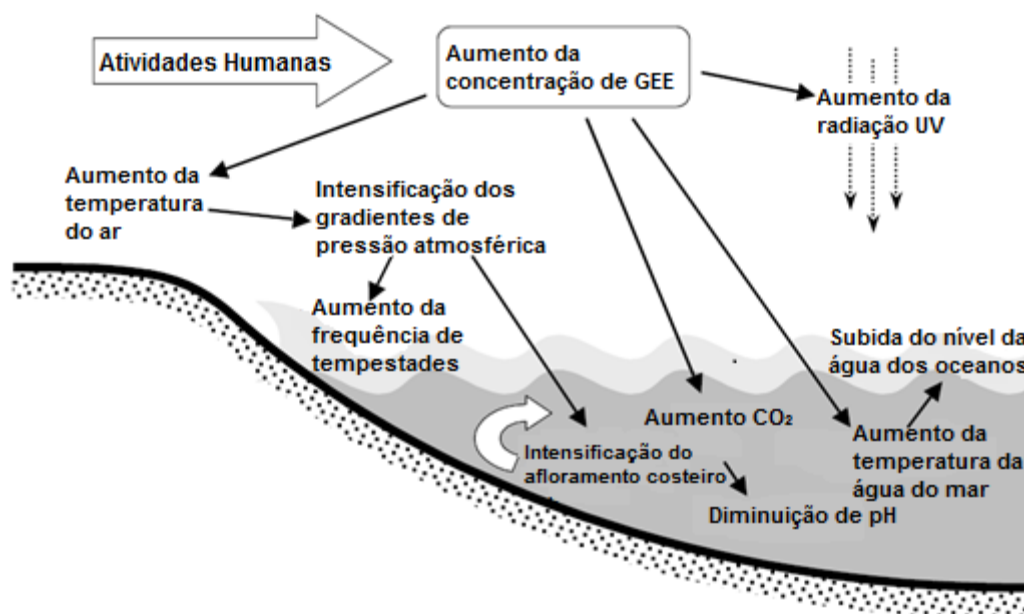


Figura 1.1. Alterações químicas e físicas dos oceanos provocadas por atividades de origem antropogénica. Adaptado de: Harley et al. (2006).

O oceano possui a capacidade de absorver o CO₂ presente em excesso na atmosfera, com isto, a crescente libertação de GEE resultou na absorção oceânica de 30% do CO₂ emitido atualmente, conduzindo à acidificação dos oceanos devido ao aumento da pressão parcial deste gás na água, interferindo no ciclo de carbono (Maulvault et al., 2019a). Esta absorção contínua de CO₂ resulta numa diminuição significativa do pH oceânico, causando um grande impacto no ecossistema marinho, afetando o metabolismo, fisiologia e bem-estar das espécies sensíveis às condições abióticas que as rodeiam, comprometendo desta forma, a sua sobrevivência e sucesso ecológico. Até ao final do século XXI, a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) tenderá a aumentar de um nível pré-industrial de 280 µatm até cerca de 1000 µatm. (Anacleto et al., 2018; Bai et al., 2008; Berdal et al., 2001; Maulvault et al., 2019a).

1.1.1. Aquecimento dos oceanos

Nos últimos cem anos, a temperatura média da terra subiu aproximadamente 0,6 °C, tendo tido dois principais períodos de aquecimento, entre 1910 e 1945, e entre 1976 e a atualidade (Figura 1.2; IPCC, 2014). Os GEE retêm parte da energia térmica (*i.e.* radiação infravermelha) o que contribui largamente para o aquecimento do planeta e do oceano (Harley et al., 2006). Para além do aquecimento das águas superficiais do oceano, há evidências de que as águas profundas também estão a aquecer (Roemmich et al., 2012).

Com o aumento da temperatura da terra e do oceano, a quantidade de vapor de água acumula-se na atmosfera a uma velocidade exponencial. Esta acumulação conduz a alterações físicas no ciclo hidrológico, provocando alterações extremas do clima, como precipitações extremas ou ausência de precipitação (*i.e.* seca). Além disso, a acumulação de vapor de água na atmosfera em combinação com a elevada temperatura superficial da água, fortes correntes de convecção, formação de nuvens, e com a estagnação do vento (velocidade e/ou direção) são as condições ideais para a formação de ciclones tropicais (Noone et al., 2013; O’Gorman e Schneider, 2009; Sumaila et al., 2011). Vários estudos indicam que a frequência e a intensidade destes ciclones têm aumentado em resultado do agravamento das alterações climáticas (Widlansky e Storlazzi, 2019). Consequentemente, estas alterações têm tido diversos impactos na sociedade (*p.e.* diminuição da qualidade da água, aumento do risco de propagação de doenças infecciosas, erosão do solo, deslizamento de terras) e na produção agrícola (*p.e.* cultivo de cereais). Outro fenómeno intimamente ligado à ocorrência de ciclones é o chamado “El Niño”, caracterizando-se por uma alteração na distribuição da temperatura da água superficial do Oceano Pacífico. Este fenómeno normalmente manifesta-se durante 15 a 18 meses, ocorrendo de forma regular em intervalos de 2 a 7 anos, resultando numa diminuição da ressurgência das águas profundas e na acumulação de água mais quente na superfície (NOAA, 2019). Atualmente a comunidade científica ainda se encontra dividida em relação à influência das alterações climáticas nos fenómenos “El Niño”, havendo dados científicos que suportam o seu agravamento e aumento de duração, enquanto alguns dados suportam o contrário (Collins et al., 2010; Oliver et al., 2018).

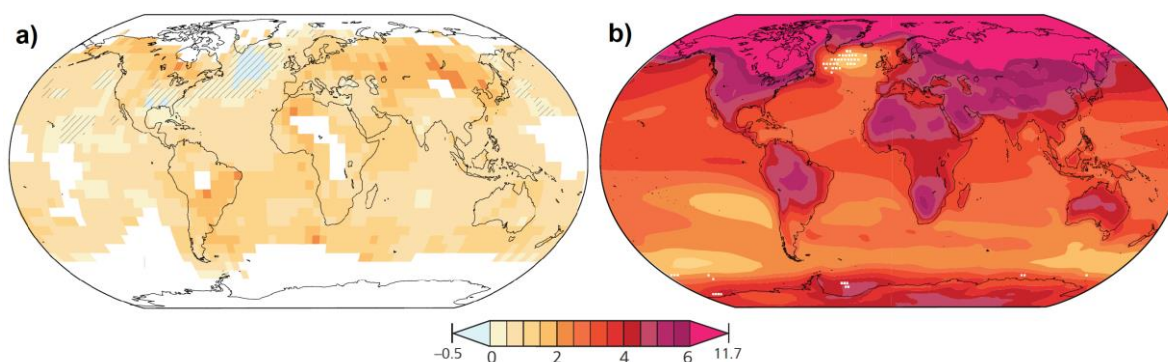


Figura 1.2. Alterações de temperatura média da superfície da terra entre (a) 1901-2012 e (b) projeções feitas segundo o cenário RCP 8.5 para 2081-2100. Fonte: IPCC (2014).

O aquecimento associado às alterações climáticas também está a provocar mudanças na sazonalidade das estações, tais como as atividades sazonais da primavera têm ocorrido progressivamente mais cedo (*p.e.* canto das aves e chegada de aves migratórias), e ainda, a tendência de os invernos ficarem sucessivamente mais quentes, podendo mesmo desaparecer nos

próximos 80 anos. Prevê-se ainda que, até 2080, os verões tenderão a ser mais quentes do que observado atualmente (Pörtner et al., 2008).

As alterações dos parâmetros abióticos da água do mar têm vindo a afetar a biologia e ecologia de muitos organismos marinhos (Marques et al., 2010). O aumento da temperatura tem um impacto negativo nas espécies marinhas, afetando os seus processos fisiológicos, nomeadamente os limites de tolerância térmica, tolerância à salinidade e turbidez elevada da água, assim como alterações nas taxas metabólicas dos organismos, taxas de alimentação (devido à disponibilidade de alimento), crescimento, reprodução e capacidade dos organismos manterem a sua homeostase interna constante face a um ambiente externo variável (Ficke et al., 2007; Noone et al., 2013; Schiedek et al. 2007). Além disso, a sobrevivência dos organismos marinhos pode ser comprometida, principalmente daqueles que realizam respiração aeróbia, uma vez que o aquecimento e a estratificação do oceano conduzem a uma reduzida recirculação de nutrientes e de oxigénio dissolvido, o que por sua vez aumenta o aparecimento de zonas anóxicas, levando a repercussões no funcionamento dos ecossistemas marinhos. Prevê-se que, até ao ano de 2100, 50% do oceano tenha concentrações muito reduzidas de oxigénio (Arrigo, 2007; FAO, 2018a; Noone et al., 2013; Riebesell et al., 2007).

Um exemplo onde as consequências do aquecimento dos oceanos são mais proeminentes é na Grande Barreira de Coral na Austrália, havendo registo de fenómenos de branqueamento de corais, conduzindo à sua morte, devido ao aquecimento global e a fenómenos de “El Niño” (Oliver et al., 2018). É de salientar que mesmo variações mínimas acima dos máximos previstos podem levar ao seu branqueamento, uma vez que os recifes de corais são extremamente vulneráveis a variações de temperatura (FAO, 2018a; Harley et al., 2006; IPCC, 2014). Atualmente, cerca de 75% dos recifes de coral existentes encontram-se ameaçados pelas alterações climáticas. Prevê-se ainda que, até 2030, 50% dos recifes de coral sofram branqueamento devido ao aquecimento dos oceanos e até 2050 cerca de 95% devido aos efeitos combinados de aquecimento e emissões abruptas de GEE's (Burke et al., 2011). O desaparecimento dos recifes de coral terá um grande impacto sobre o ecossistema marinho, visto que estes fornecem alimento e abrigo para muitas espécies de peixes, levando a uma diminuição da produtividade primária e das populações de peixes (FAO, 2018a). Além disso, a severidade dos efeitos resultantes do aumento da temperatura pode variar consoante a espécie (Berdal et al., 2001; Harley et al., 2006).

1.1.2. Acidificação dos oceanos

O carbono presente no planeta encontra-se sob a forma de compostos orgânicos e compostos inorgânicos, estando a maior parte presente na forma de gás, isto é, CO₂ atmosférico. A libertação de CO₂ realiza-se através da combustão, respiração celular e decomposição, sendo este absorvido pelas plantas e transformado parcialmente em O₂ através da fotossíntese. Desta forma, o ciclo do carbono é dividido em ciclo biológico e ciclo biogeoquímico (Figura 1.3; UCAR, 2019). O ciclo biológico inclui as trocas de CO₂ entre os seres vivos e a atmosfera através da fotossíntese, enquanto o ciclo biogeoquímico compreende a transferência de CO₂ entre a atmosfera e a litosfera. A libertação de CO₂ por processos naturais, como as erupções vulcânicas, é colmatada por processos de autorregulação. A combinação entre as emissões naturais e emissões antropogénicas em grande escala de CO₂ criaram um desequilíbrio muito acentuado no ciclo do carbono, esgotando a capacidade natural do planeta de autorregular a quantidade de CO₂, levando à sua acumulação na atmosfera (Ciais et al., 2014).

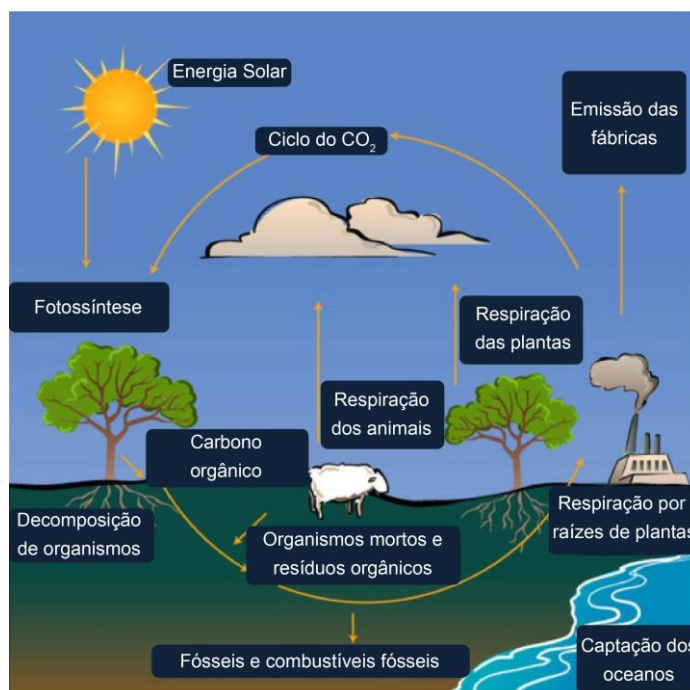


Figura 1.3. Ciclo do carbono. Adaptado de: UCAR (2019).

A capacidade do oceano absorver CO_2 de forma a manter o equilíbrio do ciclo de carbono é limitada, devido à reduzida capacidade tampão da água do mar, isto é, a capacidade de suportar variações de pH. Segundo o último relatório do IPCC, o atual aumento dos níveis de CO_2 na atmosfera é cerca de cem vezes superior do que no final das últimas eras glaciares, durante as quais os níveis de CO_2 aumentaram cerca de 80 ppm em 6 mil anos, prevendo-se que continuem a subir (Burrows et al., 2013; Devol et al., 2010; IPCC, 2014; Pörtner et al., 2008). Desde o início da Revolução Industrial, a libertação de CO_2 de origem antropogénica para a atmosfera, e subsequente transferência para o oceano, já conduziu a uma diminuição de 0,1 unidades no valor de pH das águas superficiais oceânicas (Sabine et al., 2004; Schellnhuber et al., 2006). Até ao final do século XXI, prevê-se uma diminuição do pH oceânico superficial entre 0,13 e 0,42 unidades (Figura 1.4; Devol et al., 2010; IPCC, 2014).

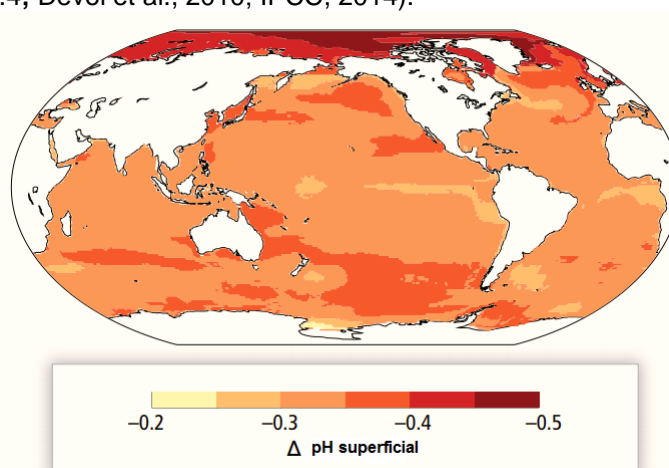
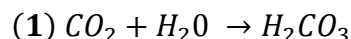
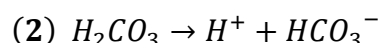


Figura 1.4. Projeção das alterações previstas do pH do oceano em 2100. Adaptado de: Hoegh-Guldberg et al. (2014).

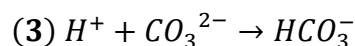
De todos os impactos previstos resultantes deste aumento inevitável do CO_2 atmosférico, um dos mais preocupantes é a acidificação das águas superficiais oceânicas, sendo o ácido carbónico um dos produtos formados pela reação entre a água do oceano e o CO_2 absorvido (Schellnhuber et al., 2006). Na atmosfera, o CO_2 é um gás quimicamente inerte, no entanto quando dissolvido em água torna-se mais reativo, podendo participar em várias reações físicas, químicas e biológicas. Deste modo, o CO_2 absorvido pelo oceano reage com as moléculas de água (H_2O) formando ácido carbónico (H_2CO_3 ; Figura 1.5; Filipe, 2015; Schellnhuber et al., 2006):



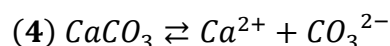
Depois de formado, o H_2CO_3 sofre dissociação, formando iões hidrogénio (H^+) e iões bicarbonato (HCO_3^-):



Com o aumento das dissociações, a concentração de H^+ aumenta, reagindo com os iões carbonato (CO_3^{2-}), formando HCO_3^- :



Esta diminuição dos iões carbonato, impede a formação de minerais de carbonato e promove a sua dissolução, ocorrendo a seguinte reação de equilíbrio (Lachkar, 2014; Pörtner et al., 2008; Zeebe, 2012):



Os iões carbonato são indispensáveis para os organismos marinhos que sintetizam minerais de carbonato de cálcio (CaCO_3), tais como a calcite e a sua forma menos estável, a aragonite, para formar conchas e esqueletos (Lachkar, 2014). Quando a concentração destes iões desce abaixo do nível de saturação, os biominerais presentes nestas estruturas podem começar a dissolver-se (Devol et al., 2010).

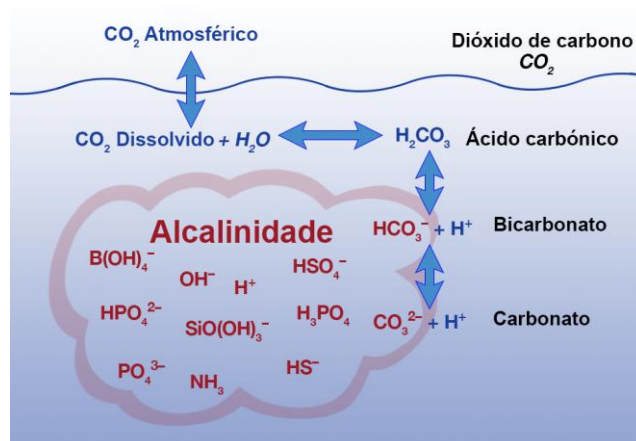


Figura 1.5. Reações químicas provocadas pelo aumento de $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ dissolvido nos oceanos. Adaptado de: NASA (2019).

Desta forma, a acidificação dos oceanos influencia os níveis de organização biológica, afetando desde as células até aos ecossistemas. Vários estudos demonstraram que a acidificação do oceano pode provocar impactos adversos nos peixes, tais como: perturbações do equilíbrio ácido-base e osmótico, disfunção respiratória, interferência nas trocas iônicas, entre outros (Heuer e Grosell, 2014; Rosa et al., 2017).

Nos peixes, o efeito da acidificação leva à alteração da composição química sanguínea, provocando a acidose, ou seja, diminuição anormal do pH do sangue (Esbaugh et al., 2012, 2016; Green e Jutfelt, 2014; Heuer et al., 2016; Rosa et al., 2017; Strobel et al., 2012). Isto pode resultar na redução da afinidade da ligação da hemoglobina ao oxigênio, sendo designado efeito de Root-Bohr (Claiborne, 1998; Wedemeyer, 1997). Cerca de 90% do CO₂ presente no sangue dos peixes está sob a forma de HCO₃⁻ plasmático. Como tal, quando estão em acidose respiratória, a compensação do organismo é conseguida através da regulação diferencial dos efluxos de HCO₃⁻ e H⁺ (que se pensa estar acoplado aos influxos de Na⁺ e Cl⁻), ajustando os níveis plasmáticos de HCO₃⁻ (Shrivastava et al., 2019).

As brânquias são os tecidos responsáveis por efetuar trocas gasosas, regulação de iões, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos azotados, e são a primeira zona exposta às variações do meio externo. De forma a conseguir responder às variações de pH, salinidade e níveis de amónia, é necessária uma elevada capacidade de transporte iónico e de excreção de amónia. Nas brânquias, os mecanismos de transporte de iões nos teleósteos marinhos são coordenados por canais iónicos, co-transportadores (*p.e.* Na⁺/K⁺/2Cl⁻), e enzimas transportadoras de iões (*p.e.* Na⁺/K⁺-ATPase; Hiroi e McCormick, 2012; Hwang et al., 2011).

Muitos estudos revelaram ainda efeitos prejudiciais do baixo pH ambiental nos processos fisiológicos de várias espécies marinhas (Walther et al., 2002; Pörtner et al., 2005; Porteus et al. 2018; Zeebe, 2012; Burrows et al., 2013). Por exemplo, o robalo (*Dicentrarchus labrax*) demonstrou reduzida capacidade olfativa, diminuição da atividade natatória e de resposta aos predadores em águas mais ácidas, enquanto o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), nas mesmas condições ambientais, revelou elevadas taxas de mortalidade na fase juvenil, observando-se também um grande impacto na reprodução, crescimento e taxas de calcificação (Porteus et al., 2018; Stiasny et al., 2016). É de salientar que nas fases iniciais de desenvolvimento, os organismos marinhos encontram-se mais vulneráveis às concentrações elevadas de CO₂, do que na fase adulta.

1.1.3. Impactos das alterações climáticas na aquacultura

Nas últimas décadas, o setor da aquacultura tem estado em grande expansão, registando-se o aumento da produção, comércio e consumo global deste tipo de pescado. A captura mundial de pescado atingiu o pico de 171 milhões de toneladas em 2016, com a aquacultura a representar 47% do total. Deste total, 108 milhões de toneladas são provenientes de águas marinhas (73% da pesca e 27% da aquacultura) e 63 milhões de toneladas em águas interiores (82% da aquacultura e 18% da pesca; FAO, 2018a). Deste modo, a aquacultura em águas interiores tem sido o principal responsável pelo crescimento do setor, representando 64% da produção total de aquacultura em 2016 (FAO, 2018a). Atualmente, a aquacultura está em crescente evolução, podendo vir a produzir metade do peixe consumido pela população humana, demonstrando o potencial do setor e o desenvolvimento contínuo da produção e do comércio de pescado (Borges, 2015; Rodiles et al., 2015). Segundo a FAO, no ano de 2030, a aquacultura dominará o mercado (FAO, 2018a; Tidwell e Allan, 2001), no entanto, prevê-se também que esta atividade seja bastante afetada pelas alterações climáticas, devido à localização geográfica dos sistemas de cultivo (*i.e.* zonas costeiras) e à exposição a eventos extremos mais intensos e frequentes

(p.e. erosão costeira, ondas de calor, secas ou inundações). Estas alterações climáticas podem colocar em risco a sustentabilidade do setor, exigindo respostas rápidas e eficazes como por exemplo a mudança dos locais de exploração e o tipo de espécies cultivadas (FAO, 2018a; Rosa et al., 2012). A temperatura é um dos parâmetros ambientais com maior impacto na biologia e ecologia das espécies marinhas, particularmente as que são produzidas em aquacultura (Anacleto et al., 2014; Madeira et al., 2012; Maulvault et al., 2017), uma vez que a maioria das espécies é poiquilotérmica, designadas vulgarmente por espécies de sangue frio, pelo que não possuem um mecanismo interno que regule a temperatura do seu corpo, dependendo assim da temperatura do meio aquático onde habitam.

Dependendo do tipo de espécie e do sistema de cultivo utilizado, as espécies com limites de tolerância térmica mais baixos irão sofrer um aumento do metabolismo, crescimento, e/ou morte quando expostas a grandes variações de temperatura (Agrawala et al., 2004; Rosa et al., 2012). De igual forma, o aumento de temperatura conduzirá a perdas de água por evaporação, o que leva ao aumento da salinidade das lagoas, podendo afetar os organismos intolerantes a altos teores de sal (Rosa et al., 2012).

O aumento da eutrofização e da estratificação também são esperados como resultado das alterações climáticas. Estes processos levam à redução do teor de oxigénio das águas, trazendo consequências para as espécies aeróbias, podendo contribuir para o aparecimento de *blooms* de algas tóxicas, o que terá um impacto negativo na produção da aquacultura (particularmente nos organismos filtradores), podendo assim apresentar riscos para a saúde humana, uma vez que o consumo acidental de produtos da pesca contaminados com estas algas pode provocar doenças graves (Dale et al., 2006; Hinder et al., 2012; Marques et al., 2010; Rosa et al., 2012).

Nos países do sul da Europa, espera-se também um decréscimo significativo de precipitação (4-27%), enquanto no norte da Europa espera-se um aumento até 16% (IPCC, 2007; Rosa et al., 2012). As inundações frequentes e intensas causam erosão ao longo da costa, afetando principalmente a aquacultura costeira, podendo resultar em mortalidade em massa dos organismos. Por outro lado, os eventos que conduzem à seca provocam a redução da disponibilidade de água nos principais sistemas de água doce (Rosa et al., 2012). Paralelamente, o aquecimento global provoca também o derretimento progressivo dos glaciares, levando ao aumento do nível médio do mar (IPCC, 2014), o que contribuirá para a destruição dos bancos de areia que são essenciais para a proteção de lagoas e outras áreas de baixa altitude.

As mudanças físicas e químicas provocadas pelas alterações climáticas podem também potenciar o aparecimento de agentes patogénicos marinhos, como parasitas, bactérias e vírus, que representam graves consequências ecológicas e socioeconómicas, e riscos para a saúde humana. A aquacultura é assim ameaçada pelo aparecimento destas patologias, especialmente em zonas como o Mediterrâneo em que a temperatura favorece o crescimento, a propagação e a transmissão destes agentes (Rosa et al., 2012).

Globalmente, espera-se que as alterações climáticas tenham um efeito negativo sobre a disponibilidade e comércio dos produtos de origem aquática, podendo surgir alterações na distribuição do pescado, assim como nos hábitos alimentares das comunidades locais e nas práticas dos produtores, exportadores e consumidores. Outra consequência será o aumento do preço do pescado, afetando não só a disponibilidade dos recursos aquáticos, mas também o custo das infraestruturas e serviços utilizados na produção, processamento e distribuição destes alimentos (FAO, 2018b). As projeções realizadas para os anos 2030 e 2050 indicam que a tendência será a diminuição global do consumo de pescado *per capita* particularmente, na Europa

(Figura 1.6; Porter et al., 2014). Daí que, se houver uma previsão antecipada das áreas vulneráveis às alterações climáticas e uma seleção de locais adequados e métodos específicos para o cultivo de determinadas espécies, será benéfico para o setor, uma vez que pode maximizar o lucro e a produção de pescado face a um clima em mudança. Deste modo, o setor da aquacultura pode focar-se na produção de espécies mais robustas às alterações climáticas e menos propensas a doenças e à deterioração da qualidade, com a finalidade de assegurar futuros benefícios alimentares e também vantagens socioeconómicas no setor. De um modo geral, estratégias de adaptação e mitigação devem também ser implementadas pelas comunidades de investigadores, decisores políticos, autoridades e agências nacionais, regionais e locais com responsabilidade na área, de modo a minimizar tais efeitos.

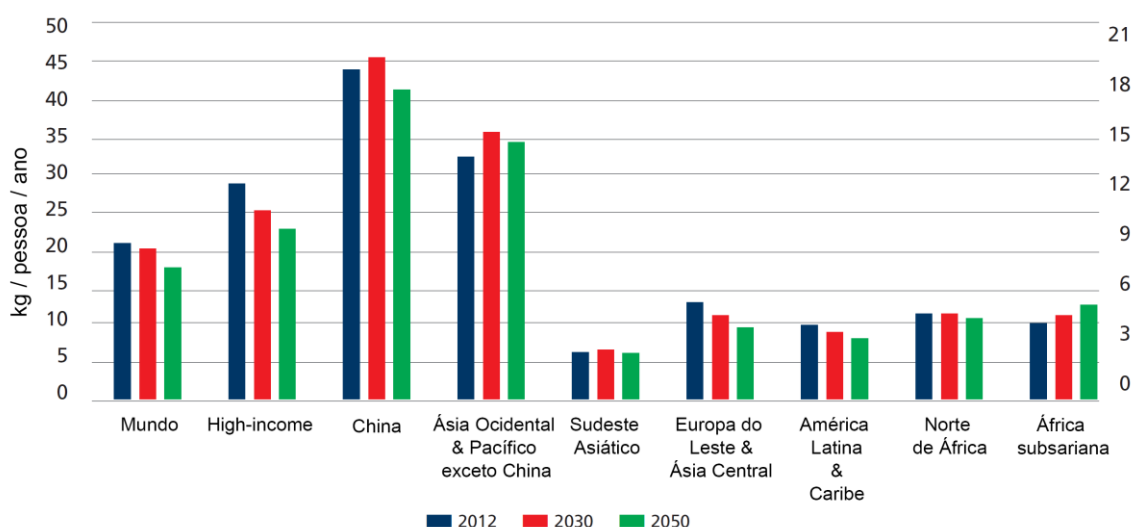


Figura 1.6. Consumo de pescado *per capita* (2012; kg/pessoa/ano) e simulação para os anos de 2030 e 2050 a nível mundial (eixo y da esquerda) e a nível regional (eixo y da direita). Adaptado de: FAO (2018b).

1.2. Composição química e qualidade nutricional do pescado

O pescado é um dos alimentos fundamentais e indispensáveis numa alimentação equilibrada, apresentando alto valor nutricional e efeitos benéficos para a saúde humana, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas e cancro (Furlong et al., 2006; Hu e Willet, 2002; Mancardi et al., 2009). Além disso, a incorporação deste tipo de alimentos na dieta humana tem sido salientada devido à grande variedade e disponibilidade de espécies e aos seus atributos sensoriais. Existem numerosos estudos que relacionam o aumento do consumo de ácidos gordos ómega-3 com a prevenção da doença arterial coronária (DAC). Também tem sido evidenciado o efeito benéfico do consumo de pescado no metabolismo das lipoproteínas, coagulação e função das plaquetas, função endotelial e rigidez arterial (Scherr et al., 2014). O pescado encontra-se fortemente presente na cultura e gastronomia Portuguesa, tendo-se registado em 2016 um consumo *per capita* de cerca de 57,0 kg/habitante/ano, que correspondeu ao terceiro valor mais elevado da União Europeia (FAO, 2018ab).

De um modo geral, os principais constituintes do pescado são a água, proteínas e lípidos, embora também apresentem uma percentagem minoritária de compostos como os sais minerais, hidratos de carbono e vitaminas (Tabela 1.1; Lourenço et al., 2012). Além disso, o pescado apresenta ainda baixo teor de colesterol (Vila Nova et al., 2005). No entanto, é de salientar a existência de um grande número de fatores que influenciam a composição química do pescado,

como a época do ano, a idade, o estado de maturação sexual, a temperatura, a salinidade e os padrões de migração (Huss, 1995).

Embora as diferentes espécies de pescado apresentem teores de gordura distintos, o pescado é umas das principais fontes de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (PUFA), sendo os mais importantes os ácidos gordos do tipo ômega-3, nomeadamente o ácido eicosa-pentaenóico (20:5 ω 3; EPA) e o ácido docosahexaenóico (22:6 ω 3; DHA; Andrade et al., 2009; Khalili e Sampels, 2018; Lourenço et al., 2012).

Tabela 1.1. Composição química (%) de diferentes espécies de pescado produzidas em aquacultura. Adaptado de: Bannar et al. (2004).

	Água (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)
Linguado	78,1	20,1	0,2	1,4
Bacalhau	76,2	19,0	0,4	3,4
Tamboril	80,4	17,9	0,2	1,1
Cavala	64,3	20,3	13,4	1,4
Atum	69,7	24,8	3,5	1,7
Salmão	60,5	21,9	16,2	1,3
Polvo	83,1	15,6	10,2	0,9

1.2.1. Água

O principal constituinte do músculo do pescado é a água, representando geralmente cerca de 80% do peso corporal. Em peixes gordos, este teor é cerca de 70%, podendo atingir os 80% em peixes magros, mas em certas espécies podem encontrar-se teores de água variáveis entre 70 e 90%. As espécies magras apresentam um teor de humidade superior ao das espécies gordas visto que o teor de humidade varia na razão inversa ao teor lipídico. Esta variação é mais acentuada na época de postura, na qual ocorre uma depleção das reservas energéticas. Durante este período, também se observa uma diminuição do conteúdo proteico, resultando num aumento da percentagem de água nos tecidos. A água no músculo do peixe fresco está fortemente ligada às proteínas e também na forma livre (Andrade et al., 2009; Shaw et al., 2000).

1.2.2. Proteínas

O teor de proteína no músculo do pescado varia entre 15 e 20%, no entanto, ocasionalmente é possível encontrar espécies nas quais a quantidade de proteína é inferior a 15% ou superior a 20% (Andrade et al., 2009; Usydus et al., 2011). Além disso, o teor de proteína é mais estável comparativamente ao teor de água e lípidos, pelo que, numa mesma espécie, o teor de proteínas não apresenta diferenças significativas durante o ciclo de vida. Porém, em determinadas fases do ciclo de vida, tais como a maturação das gónadas ou mesmo quando ocorre privação de alimento por longos períodos de tempo, o teor proteico pode diminuir (Kushi et al., 2018). Considera-se que as proteínas do músculo do peixe têm um elevado valor nutricional, uma vez que apresentam teores elevados de aminoácidos essenciais (Khalili e Sampels, 2018; Venugopal e Shahidi, 1996).

As proteínas no tecido muscular de peixe podem ser divididas em três grupos (Horton et al., 1996; Huss, 1995):

- Proteínas estruturais (como por exemplo a actina, miosina, tropomiosina e troponina) que constituem 70 a 80% do conteúdo total de proteína;
- Proteínas sarcoplasmáticas (como por exemplo a mioalbumina, mioglobina e enzimas) que constituem 25 a 30% da proteína total;
- Proteínas do tecido conjuntivo (como por exemplo o colagénio), que constituem aproximadamente 3% da proteína em peixes ósseos e cerca de 10% em peixes cartilagíneos.

As proteínas agem como um componente estrutural das células e dos organismos, sendo constituídas por aminoácidos ligados quimicamente entre si para formar a estrutura de macromolécula da proteína. A proteína do pescado fornece assim uma excelente combinação de aminoácidos altamente adequada aos requisitos nutricionais da população humana (Maulvault, 2009; Usydus et al., 2011). Além disso, a miosina é rica em ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, leucina e isoleucina, perfazendo juntos 55% dos aminoácidos totais. A sua concentração pode variar em função da espécie, género e estações do ano (Ramos Filho et al., 2008). Para além do teor em aminoácidos essenciais, é de notar que o pescado apresenta uma baixa percentagem de tecido conjuntivo e que este, por sua vez, é facilmente degradado pelas enzimas digestivas, o que lhe confere elevada digestibilidade (Maulvault, 2009).

1.2.3. Lípidos

Os lípidos são um grupo muito diversificado de compostos hidrofóbicos, cujas unidades básicas são os ácidos gordos (FAs). Desempenham um papel importante na fisiologia dos peixes, como fonte de energia metabólica para o crescimento, assim como para a reprodução e locomoção (Andrade et al., 2009; Venugopal e Shahidi, 1996). Os lípidos são assim utilizados como reservas energéticas, sinalizadores intra e intercelulares, isoladores térmicos e elétricos, tendo ainda como função a formação, manutenção e preservação das membranas celulares (Venugopal e Shahidi, 1996).

Os lípidos podem ser classificados como (Horton et al, 1996; Huss, 1995):

1. Lípidos neutros, que incluem os acilgliceróis (mono-, di-, e tri-), ácidos gordos livres, colesterol e outros esteróis;
2. Lípidos polares, nomeadamente, os fosfolípidos que por participarem na formação das membranas celulares, são também denominados lípidos estruturais. Estas moléculas são constituídas por ácidos gordos, isoprenóides, álcoois, açúcares e ácido ortofosfórico.

O teor lipídico varia de acordo com muitos fatores tais como a espécie, o género e o habitat (Borges, 2015; Maulvault, 2009). No entanto, é o componente nutricional que apresenta maior variação no pescado pois é diretamente influenciado pela alimentação e ciclo reprodutor dos organismos. Dependendo da percentagem lipídica, o pescado pode ser classificado como magro (<5%), semi-gordo (entre 5-10%), e gordo (>10%; Tabela 1.1). O linguado e a pescada são exemplos de espécies magras, em que a maioria das suas reservas energéticas estão localizadas no fígado sob a forma de triacilgliceróis, enquanto a restante parte localiza-se no músculo sob a forma de fosfolípidos. Como peixes semi-gordos temos o peixe-espada e o rodovalho, em que a gordura pode ficar depositadas em partes limitadas dos tecidos. Por outro lado, o salmão e a cavala são exemplos de peixes gordos, onde geralmente as reservas energéticas encontram-se no músculo, sob a forma de uma camada de gordura subcutânea e nas vísceras (Bandarra et al., 2004; Maulvault, 2009; Venugopal e Shahidi, 1996). Além disso, os peixes de músculo mais

claro (p.e. bacalhau, corvina) apresentam geralmente menor teor lipídico do que os de músculo escuro (p.e. atum, sardinha; Bandarra et al., 2004; Venugopal e Shahidi, 1996).

1.2.3.1. Ácidos gordos

Os ácidos gordos (FAs) são a unidade básica dos lípidos, são constituídos por um grupo ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) num extremo da molécula e um grupo metilo ($-\text{CH}_3$) não funcional, no extremo oposto, ligados entre si por uma longa cadeia alquílica que pode ser saturada ou insaturada. Classificam-se de acordo com o comprimento da cadeia, número, posição e configuração das ligações duplas. Os FAs mais comuns em alimentos de origem animal são compostos por cadeias pares contendo 16 a 22 átomos de carbono e podem conter entre 0 a 6 ligações duplas na configuração *cis*. Os FAs são designados por saturados (SFA) se não possuírem ligações duplas na sua estrutura molecular, ou por insaturados se tiverem pelo menos uma ligação dupla. Estes últimos podem ser monoinsaturados (MUFA), quando possuem apenas uma ligação dupla, ou polinsaturados (PUFA), quando possuem duas ou mais ligações duplas (Fernández et al., 2009; Forman et al., 1997; Kushi et al., 2018; Njinkoué et al., 2002; Rasoarahona et al., 2005). Os FAs são produzidos no fígado, de onde são transferidos posteriormente para outros tecidos. No que respeita às funções principais e fundamentais nos peixes, os FAs atuam como fonte energética, componentes de membrana, e precursores de eicosanóides, compostos que são essenciais para processos de regulação celular (Kushi et al., 2018; Maulvault, 2009; Rasoarahona et al., 2005; Venugopal e Shahidi, 1996).

A composição de FAs no pescado resulta de interações complexas entre os efeitos nutricionais, fisiológicos e ambientais, que atuam simultaneamente no organismo. Todas as espécies de vertebrados requerem uma determinada quantidade de ácidos gordos essenciais (EFAs), os quais não são sintetizados bioquimicamente e, portanto, devem ser adquiridos na dieta, pois são nutricionalmente indispensáveis (Tabela 1.2; Fernández et al., 2009). Os principais EFAs são os FAs ómega-3 ($\omega 3$) e ómega-6 ($\omega 6$) em que a primeira ligação dupla ocorre no terceiro ou sexto átomo de carbono a partir do terminal metilo da molécula, respetivamente. Daí que, as fontes de FAs $\omega 3$ obtidas através da ingestão de alimentos são muito importantes, uma vez que estes EFAs melhoram o desenvolvimento e funcionamento dos sistemas nervoso e reprodutivo, mas também são indicados na redução do risco de doenças cardíacas, hipertensão, redução da incidência de diabetes e prevenção de arritmias cardíacas (Fernández et al., 2009; Kushi et al., 2018; Ramos Filho et al., 2008).

Tabela 1.2. Valor nutricional de diferentes espécies de pescado produzidas em aquacultura, em peso húmido. Adaptado de: Bandarra et al. (2004).

Espécie	Lípidos (g/100g)	Ácidos Gordos (mg/100g)		
		EPA	DHA	Ómega-3
Linguado	0,2	8,4	29,0	52,3
Sardinha	10,9	1671,8	1169,4	3753,3
Dourada	8,3	425,1	1207,0	2245,6
Bacalhau do Atlântico	0,4	35,5	91,4	212,3
Abrótea-do-Alto	0,1	4,2	26,0	32,2

No pescado podemos encontrar uma grande variedade de SFA, MUFA e PUFA. O maior benefício nutricional que o pescado apresenta em relação aos mamíferos e também aos óleos vegetais é a elevada concentração de PUFA, que geralmente representa 40% do total de FAs.

Os SFA mais comuns no pescado são o ácido mirístico (MA, C14:0), ácido palmítico (PA, C16:0, encontrado em grandes concentrações), e o ácido esteárico (EA, C18:0). No pescado, o MUFA que se encontra em muitos organismos é o ácido oleico (AO, C18:1 n-9) e, finalmente, no caso do PUFA temos principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA, 8-12%) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 10-20%), e ainda os ácidos linoleico (LA, 18:2 ω 6) e α -linolénico (ALA, 18:3 ω 3). Nos humanos, a taxa de conversão do ácido α -linolénico (ω 3) é muito baixa, e à medida que a concentração de ácido linoleico (ω 6) aumenta, a taxa de conversão do ácido α -linolénico tende a diminuir, uma vez que, os dois substratos competem pelo mesmo sistema enzimático. Desta forma, as fontes de ω 3 obtidas através da ingestão de alimentos são muito importantes (Dayhuff e Wells, 2005; Maulvault, 2009; Özogul et al., 2007).

Diversos estudos revelam que o EPA é essencial no tratamento de distúrbios cerebrais e no tratamento de cancro, enquanto o DHA tem vindo a ser considerado importante no desenvolvimento cerebral e ocular, e também na prevenção de doenças cardiovasculares (Özogul et al., 2007). Tem sido relatado que as populações que consomem entre 0,5 a 0,7 g/dia de DHA têm menor incidência de doenças cardíacas, sendo que a recomendação para ingestão diária de DHA/EPA é de 0,5 g para lactantes e 1 g/dia para adultos e doentes cardíacos (Özogul et al., 2007). Deste modo, a American Heart Association (AHA) e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) recomendam um consumo regular de peixe de modo a fornecer entre 250 a 500 mg de ácidos ω 3-PUFA (EPA+ DHA) diariamente (AHA, 2017; EFSA, 2017). Por outro lado, uma elevada proporção de FAs ω 6/ ω 3, como as atualmente encontradas em dietas nos países desenvolvidos e industrializados, promove o desenvolvimento de muitas doenças crónicas, incluindo doenças cardiovasculares e carcinogénicas (Fernández et al., 2009; Kushi et al., 2018; Ramos Filho et al., 2008).

Para além do seu importante papel nutricional, os FAs têm um potencial considerável como biomarcadores, pelo que as análises de FAs em peixes podem ser utilizadas como indicadores das condições do habitat dos organismos podendo constituir uma ferramenta muito útil e importante na implementação de políticas ambientais (Dayhuff e Wells, 2005).

1.2.4. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono podem ser designados por glícidos, glúcidos, sacarídeos ou açúcares, e têm como principal função fornecer energia. Podem ser divididos em hidratos de carbono simples (p.e. lactose e frutose) ou complexos (p.e. fibras e amido). Os hidratos de carbono simples são constituídos por cadeias de açúcares menores que rapidamente são absorvidas, enquanto os complexos são constituídos por cadeias longas, necessitando de um maior tempo para a sua digestão e absorção, como é o caso do amido que está presente em diversos alimentos, tais como leguminosas, arroz e batatas (Romsy, 2016).

No pescado, os hidratos de carbono pertencem ao grupo dos constituintes minoritários cujo teor representa entre 0 e 1%, podendo ser maior nos bivalves. Exemplos de hidratos de carbono no pescado são o glicogénio, mucopolissacáridos, açúcares livres e fosfossacáridos. Apesar do teor de hidratos de carbono ser reduzido, o pescado tende a acumular as suas reservas energéticas sob a forma de glicogénio, sendo maioritariamente encontrado no fígado e músculo (Hemre et al., 1991). O teor de hidratos de carbono pode também influenciar a textura do pescado, pois a transformação de glicogénio em ácido láctico pode influenciar a velocidade do processo de *rigor mortis* e o pH do músculo, e pode ainda proporcionar o desenvolvimento de microrganismos (FAO, 1995).

1.2.5. Vitaminas

Como referido anteriormente, o pescado é também uma fonte importante de micronutrientes, tais como as vitaminas e os minerais. As vitaminas são essenciais e necessárias em quantidades menores relativamente aos ácidos gordos. O organismo humano não consegue sintetizar vitaminas em quantidades suficientes, pelo que estas têm de ser adquiridas através da dieta. Assim como os restantes componentes nutricionais, o teor de vitaminas também varia de acordo com a espécie de peixe, habitat e altura do ano. As vitaminas podem ser divididas em vitaminas lipossolúveis (como, por exemplo as vitaminas A, D, E) e hidrossolúveis como, por exemplo, as vitaminas do complexo B como a B6 e B12; Menezes, 2006; Venugopal e Shahidi, 1996).

As vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D e E) estão presentes no pescado em teores variáveis (Tabela 1.3) e, em muitos casos, observam-se concentrações mais elevadas comparativamente com os animais terrestres. A vitamina A desempenha um papel importante na visão, pois a deficiência no seu consumo constitui a principal causa de cegueira na infância. O músculo de um peixe magro contém cerca de 0,6 a 5,0 µg/100 g de vitamina A, enquanto nos peixes gordos, como a cavala e o arenque, o teor varia entre 5,0 e 37,5 µg/100 g de peso húmido (Saunders et al, 2007; Venugopal e Shahidi, 1996). Relativamente à vitamina D, esta favorece a absorção de cálcio e fósforo no intestino. Vários estudos demonstraram uma correlação significativa entre a maior ingestão de peixe e um menor risco de fraturas ósseas (Marques, 2013; Nogueira, 2017). Além de problemas ósseos, a deficiência em vitamina D tem sido associada a diabetes, cancro, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (Khalili e Sampels, 2018). Os peixes gordos também contêm níveis significativos de vitamina D, e mediante a espécie, o conteúdo de vitamina D varia entre 0,5 e 30 µg/100 g de peso húmido. A vitamina E é um antioxidante que protege as células dos danos causados pelos radicais livres, e é indispensável ao organismo uma vez que atua como antioxidante natural e reduz o teor de LDL (lipoproteína de baixa densidade), a concentração encontrada no pescado pode variar entre 0,2 e 1000 µg/100 g de peso húmido (Menezes, 2006; Venugopal e Shahidi, 1996). O músculo do peixe também apresenta quantidades consideravelmente elevadas de vitaminas B1, B2, e ainda B6 e B12 que são essenciais para o metabolismo dos hidratos de carbono e para a formação dos glóbulos vermelhos (Maulvault, 2009; Menezes, 2006; Venugopal e Shahidi, 1996).

Tabela 1.3. Concentração de vitaminas encontradas em diferentes espécies de pescado produzidas em aquacultura, em peso húmido. Adaptado de: Bandarra et al. (2004).

Espécie	Vitamina A (µg/100g)	Vitamina E (µg /100g)	Vitamina D (µg/100g)	B1 (µg /100g)	B2 (µg /100g)	B6 (µg /100g)	B12 (µg/100g)
Linguado	4,4	320	9,4	91	130	330	0,94
Sardinha	12,0	25	17	18	140	410	10
Dourada	11,0	820	12	200	780	360	4,8
Bacalhau do Atlântico	3,8	280	4,5	47	68	72	0,95
Abrótea- do-Alto	0,65	38	<0,70	34	27	64	0,44

1.2.6. Minerais

Os minerais são substâncias inorgânicas essenciais na manutenção dos tecidos do corpo humano. Estes representam 4-5% do peso corporal de um adulto, dos quais 50% são cálcio (Ca) e 25% são fósforo (P), localizando-se maioritariamente nos ossos e dentes. Os minerais possuem função reguladora, contribuindo para o equilíbrio osmótico (*p.e.* bomba de sódio e potássio), equilíbrio ácido-base, estímulos nervosos, ritmo cardíaco e atividade metabólica (Tognon, 2012). Estes elementos denominam-se essenciais quando a sua carência que resulta de serem fornecidos em doses inferiores às necessárias para repor os níveis do organismo, pode afetar o desenvolvimento, funções metabólicas normais, e, em casos extremos, conduzir à morte (Gharibzadeh e Jafari, 2017; Oehlenschläger, 1997). Os elementos essenciais podem dividir-se em macroelementos e microelementos. Os macroelementos são os que têm de ser ingeridos em elevadas concentrações [100 mg/dia; *p.e.* sódio (Na), potássio (K), fósforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca)] já os microelementos devem ser ingeridos em doses mais baixas e incluem, entre outros, o ferro (Fe), o zinco (Zn), o cobre (Cu), o manganês (Mn) e o selénio (Se) (Tabela 1.4; Meneses et al., 2006; Tognon, 2012). Existe ainda uma classe de minerais denominada não-essenciais, cujas funções metabólicas são desconhecidas e podem ser tóxicos mesmo em concentrações reduzidas (*p.e.* európio (Eu) e rubídio (Rb); Belitz e Grosch, 1999; Yuyama, et al., 1999). Além disso, o mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsénio (As) são elementos tóxicos que podem ser assimilados, armazenados e concentrados pelos organismos vivos, através da cadeia alimentar, dando origem a graves efeitos fisiológicos (Goyer e Clarkson, 2001; Ruiter, 1995).

A concentração de minerais geralmente encontrada no pescado varia entre 0,6 e 1,5%, pelo que o pescado representa uma fonte importante de vários macro e microelementos, os quais desempenham um papel fundamental na nutrição (Menezes, 2006; Venugopal e Shahidi, 1996).

Tabela 1.4. Teor de minerais encontrados em diferentes espécies de pescado produzidas em aquacultura, em peso húmido. Adaptado de: Bandarra et al. (2004).

Espécie	Minerais (mg/100g)								
	Ca	P	Mg	Fe	Na	K	Mn	Cu	Zn
Linguado	21	218	33,0	0,3	88,0	389	<0,02	0,03	0,6
Sardinha	70	296	29	1,7	65	404	<0,02	<0,03	1,7
Dourada	15	252	25	0,5	59	383	<0,02	<0,03	0,8
Bacalhau do Atlântico	33	116	23	0,2	1483	36	<0,02	<0,03	0,8
Abrótea-do-Alto	11	229	28	0,2	63	358	0,02	0,06	0,5

1.2.6.1. Macroelementos essenciais

O potássio e o sódio são necessários para vários processos como a manutenção da frequência cardíaca, produção de energia e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Romsy, 2016; Tognon, 2012). O sódio é o principal catião do meio extracelular e é necessário para a manutenção da pressão osmótica no meio extracelular. Níveis reduzidos de sódio no sangue levam à perda de volume de água e diminuição da tensão arterial. O elevado teor de sódio no sangue leva à produção de hormonas que permitam reter água de forma a equilibrar as concentrações. Por sua vez, a retenção de água faz aumentar o volume de sangue, aumentando a frequência cardíaca e a pressão sanguínea (Lukaski, 2004). Deste modo, a ingestão em excesso

ou déficit deste mineral pode levar a várias desordens. Assim, o seu excesso leva a cenários de hipertensão e o seu déficit conduz a cenários de pressão baixa e fraqueza muscular (Belitz e Grosch, 1999; Lukaski, 2004). Relativamente ao potássio, este é o principal catião do meio intracelular, necessário para a transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, regulação do conteúdo celular da água, e finalmente, é necessário na síntese proteica e glúcidos (Biezanowska-Kopec et al., 2016; König et al., 2009; Lukaski, 2004). Existem vários sintomas associados à deficiência em potássio, nomeadamente fraqueza muscular e letargia, os quais podem resultar da subnutrição ou de uma dieta pobre em potássio (Belitz e Grosch, 1999).

O fósforo e o cálcio são necessários para a formação dos ossos e dentes, participam no metabolismo de proteínas, das gorduras e dos hidratos de carbono e são importantes para o funcionamento de diversos sistemas enzimáticos (Romsy, 2016; Tognon, 2012). O fósforo representa cerca de 700 g do peso corporal de um adulto, e cerca de 85% do fósforo está presente nos ossos e dentes. Este mineral, participa no metabolismo energético, sendo fundamental para manter o equilíbrio ácido-base, e é ainda constituinte de muitas biomoléculas tais como os fosfolípidos e os ácidos nucleicos. O excesso de fósforo pode levar à alteração da razão cálcio/fósforo provocando a mobilização do cálcio dos ossos para o sangue (Lukaski, 2004; Trindade, 2005; Williams, 2005). O cálcio tem a função principal de manutenção e formação adequada do esqueleto. Participa também na condução de impulsos nervosos, libertação de hormonas e contrações musculares. A dose recomendada deste mineral varia com a idade e o estado fisiológico, sendo que crianças, adolescentes e grávidas têm normalmente de ingerir maior quantidade deste mineral. Por outro lado, o excesso deste mineral pode levar à hipercalcemia (aumento da concentração de cálcio no sangue) e calcificação dos tecidos moles, e pode ainda interferir na absorção do ferro, zinco e manganês (König et al., 2009; Trindade, 2005; Williams, 2005).

O magnésio é necessário para estabilizar a estrutura do ATP durante a atividade enzimática, é um constituinte da estrutura óssea e exerce um papel importante no relaxamento muscular (Romsy, 2016; Tognon, 2012). Nos adultos, encontra-se distribuído maioritariamente nos ossos e músculo, e em menor concentração nos tecidos moles e fluidos. A carência neste mineral pode conduzir à deficiência muscular, depressão, vertigens e espasmos musculares (Spencer et al., 1980; Williams, 2005).

1.2.6.2. Microelementos essenciais

O ferro é um microelemento essencial, pelo que cada adulto saudável tem entre 2,4 e 3,5 g de ferro no organismo (Tognon, 2012). Este mineral está normalmente associado a proteínas funcionais, maioritariamente à hemoglobina e mioglobina, e também a proteínas de reserva e/ou transporte. O ferro é estritamente necessário para o crescimento saudável, desenvolvimento intelectual e imunocompetência. A sua carência pode provocar anemias, enquanto o excesso pode levar ao *stress* oxidativo e à saturação das capacidades de acumulação da ferritina e acumulação da hemossiderina que é insolúvel, podendo levar ao aparecimento de lesões (Drago e Valencia, 2002; Williams, 2005).

O zinco desempenha uma função reguladora no controlo e coordenação do crescimento celular. Este mineral é fundamental para a função catalítica de diversas enzimas e para a estrutura e função de muitas outras proteínas, nomeadamente de recetores hormonais e de fatores de transcrição, estando, assim, envolvido no controlo da expressão de múltiplos genes (Reilly, 2004). O zinco é um forte antioxidante e desintoxicante, sendo também essencial para o crescimento dos tecidos corporais e regulação da insulina (Solomons, 1993; FAO, 1998). A carência deste mineral pode causar atrasos no crescimento, diminuição da acuidade visual, olfativa e

gustativa, lesões na pele, e imunodeficiência (Drago e Valencia, 2002; Trindade, 2005). Nos países em desenvolvimento, o déficit neste mineral é muito elevado (OMS, 2003).

O cobre é um microelemento essencial e indispensável na absorção de ferro, na síntese da hemoglobina, na manutenção da saúde óssea e do sistema nervoso central (Tognon, 2012), sendo o centro ativo de inúmeras metaloenzimas (Lall, 1995), nomeadamente de enzimas antioxidantes (Belitz e Grosch, 1999). Défices de cobre no organismo humano podem provocar anemia e síndrome de Menke's em crianças (Linder e Hazeigh-Azam, 1996). Por outro lado, o excesso deste mineral pode originar a doença de Wilson (Pedrosa e Cozzolino, 1999).

Embora não seja tóxico a concentrações baixas para os humanos, o metabolismo do cobre nos peixes e os efeitos tóxicos provenientes da poluição do meio marinho têm sido alvo de estudos (Celik e Oehlenschläger, 2004).

O manganês encontra-se principalmente nos ossos, no fígado, no pâncreas e nos rins. Participa na formação do tecido conjuntivo, ajuda na coagulação do sangue, atua como cofator de enzimas antioxidantes e é indispensável no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos e do colesterol (Burch et al., 1975; Emsley, 2013). Este mineral tem outras funções importantes como a relevância na absorção de cálcio, regulação da glucose no sangue e formação óssea (Burch et al., 1975). A deficiência severa dos níveis de manganês podem resultar em perda de peso, disfunção pancreática e deformação óssea (Crossgrove e Zheng, 2004).

O selénio é o co-fator da peroxidase do glutationa, que é muito importante na defesa antioxidante, sendo, por isso, necessário para a manutenção da integridade das membranas celulares (Biezanowska-Kopec et al., 2016; Trindade, 2005). De um modo geral, o selénio fornecido pelo pescado fica mais biodisponível do que o selénio fornecido por outros alimentos (Khalili e Sampels, 2018). Um dos importantes benefícios do selénio no pescado está associado ao fato deste elemento e o mercúrio interagirem antagonicamente, e desta forma o selénio ter a capacidade de reduzir a toxicidade do mercúrio quando ambos os elementos são simultaneamente ingeridos (Kehrig et al., 2013; Matos, 2014).

1.3. Efeitos das alterações climáticas na qualidade nutricional do pescado

As alterações climáticas são uma das maiores ameaças ambientais do presente século, tendo consideráveis impactos tanto nos ecossistemas, a nível da biologia e ecologia dos organismos que habitam os diferentes meios, como na qualidade e segurança alimentar, de forma direta ou indireta, podendo constituir riscos para a saúde humana (Marques et al., 2010). Segundo a FAO (1996), a segurança alimentar ("food security") ocorre quando "todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos que satisfaçam as suas necessidades e preferências alimentares por um tipo de vida ativa e saudável". No entanto, a necessidade de evitar que a alimentação possa constituir uma forma de transmissão de doenças, fez com que o conceito de segurança alimentar passasse também a incluir a garantia da inexistência nos alimentos de perigos biológicos, químicos ou físicos passíveis de colocar em causa a saúde dos consumidores ("food safety").

Existem diversos perigos biológicos e químicos que podem comprometer a segurança alimentar e a qualidade nutricional do pescado em virtude das constantes mudanças que estão a ocorrer no clima. Entre estes perigos, destacam-se os metais tóxicos (p.e. metilmercúrio, cád-

mio, chumbo e arsénio), resíduos químicos orgânicos [p.e. pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)], biotoxinas marinhas (p.e. saxitoxina, responsável pela intoxicação paralisante e designada por PSP “Paralytic Shellfish Poisoning”; ácido domóico, responsável por intoxicações amnésicas e designadas por ASP “Amnesic Shellfish Poisoning”; toxinas como o ácido ocadáico, responsáveis por intoxicações diarreicas e designadas por DSP “Diarrhetic Shellfish Poisoning”) e microrganismos patogénicos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp.; Marques et al., 2010).

Existem muitos fatores que influenciam diretamente a qualidade nutricional do pescado, entre os quais a alimentação é um dos fatores de maior influência, bem como, os fatores abióticos, como, por exemplo, temperatura, pH e salinidade da água do mar (Navarro et al., 2010). Apesar dos impactos das alterações climáticas na saúde e bem-estar humano e animal serem tópicos amplamente debatidos, as suas consequências na qualidade, segurança e produção do pescado têm recebido pouca atenção até à data. Nos poucos estudos publicados, em espécies como amêijoas (*Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*), mexilhão (*Mytilus edulis*), ostra (*Crassostrea gigas*) e caracóis marinhos (*Turbo militaris* e *Dicathais orbita*), verificaram-se reduções significativas nos teores de proteína e hidratos de carbono e na composição de ácidos gordos insaturados, particularmente $\omega 3$, e um aumento nos teores de SFA no pescado sujeito a condições de aquecimento e acidificação dos oceanos (Anacleto et al., 2014; Clements et al., 2018; Flores-Vergara et al., 2004; Lah et al., 2018; Tate et al., 2017; Valles-Regino et al., 2015). Segundo Tate et al. (2017), os efeitos combinados do aquecimento e da acidificação no gastrópode marinho *Dicathais orbita*, provocaram uma diminuição de 45% no teor de proteína após 35 dias de exposição. Em cenários de aquecimento e no caso dos animais poiquilotérmicos, particularmente os peixes, os quais não possuem mecanismos internos de regulação da temperatura corporal, é observada uma diminuição do teor de FAs insaturados com o aumento da temperatura (Khalili e Sampels, 2018). Por outro lado, observou-se que espécies como o salmão do Pacífico e a truta (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a temperaturas mais baixas resultam numa menor acumulação de SFA e a maiores proporções de FAs insaturados. Vários autores demonstraram também ocorrer uma diminuição da bioconversão de ácido alfa-linolénico (ALA) para EPA e DHA a temperaturas mais elevadas (Khalili e Sampels, 2018; Liu et al., 2017). Relativamente à salinidade, alguns autores verificaram haver uma correlação direta entre este parâmetro e o teor de lípidos. Além disso, o conteúdo de MUFA no robalo (*Dicentrarchus labrax*) apresentou valores mais baixos, tendo-se verificado uma maior proporção de PUFA a salinidades mais baixas (Roche et al., 1983). Liu et al. (2017) também verificou que o juvenil de sável americano (*Alosa sapidissima*) sujeito a baixa salinidade, resultava no aumento de MUFA e PUFA. De um modo geral, ao considerar os efeitos da salinidade, as espécies sujeitas a maiores adaptações ambientais sofrem maiores variações no teor de gordura, tendo um maior teor de gordura no seu habitat de origem. Por exemplo, os salmonídeos apresentam um maior teor de gordura quando estão em migração para a água salgada em comparação com o ambiente onde eclodem (Liu et al., 2017).

De um modo geral, os estudos efetuados até ao momento indicam que as alterações climáticas têm efeitos na composição química do pescado, nomeadamente em cenários de aquecimento e acidificação ocorre aumento do teor lipídico, conversão de ácidos gordos polinsaturados em saturados, e diminuição dos teores de proteína. Deste modo, a qualidade nutricional do pescado pode ficar comprometida, o que pode representar riscos para a saúde humana. Além disso, pode ainda afetar a procura e consumo do produto por parte do consumidor. É assim importante efetuar em estudos futuros uma análise de risco e benefício do pescado num contexto de alterações climáticas.

1.4. Modelo biológico: Linguado (*Solea senegalensis*)

O linguado branco (*Solea senegalensis*) é uma espécie marinha bentónica geralmente encontrada no Golfo da Biscaia e muito abundante em águas mediterrâneas e sul atlânticas. É uma espécie demersal solitária, que habita fundos arenosos ou lamacentos, distribuindo-se desde a plataforma continental até 100 m de profundidade. Morfologicamente, possui um corpo oval e achatado com os olhos na parte superior situados no lado direito. Apresenta a barbatana caudal unida ao último raio das barbatanas anal e dorsal por uma membrana bem desenvolvida. As barbatanas peitorais são bem desenvolvidas no lado oculado e no lado cego. Na parte inferior tem coloração branca e castanha escura na parte superior com um padrão que se assemelha aos fundos arenosos onde habita (Fernández et al., 2009; Tapia-Paniagua et al., 2010). O tamanho médio do adulto é de 30 a 40 cm, mas pode atingir até 70 cm de comprimento médio (Figura 1.7).



Figura 1.7. *Solea senegalensis*. Fonte: Dimaltrans (2019).

A maturidade sexual é atingida aos 3 anos ou quando o comprimento total é de cerca de 32 cm. A época de desova, que decorre ao longo de várias semanas, dá-se principalmente entre os meses de março e junho, podendo ocorrer um segundo período de desova mais curto em setembro. A desova é altamente dependente da temperatura da água, a qual deve estar entre 15-20 °C (Borges, 2015).

Esta espécie de peixe chato apresenta um sistema digestivo caracterizado por um intestino longo, bem como uma digestão alcalina predominante no seu intestino, características estas que são típicas de peixes omnívoros (Rodiles et al., 2015). No seu habitat natural, esta espécie alimenta-se de poliquetas, bivalves, moluscos e crustáceos (Borges, 2015; Makridis et al., 2005). Esta espécie é geralmente capturada por pesca de tresmalho e arrasto de fundo, uma vez que são peixes de atividade natatória reduzida e noturna (Villanueva e Alonso, 2014).

Além disso, o linguado apresenta elevado teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e de minerais (potássio, fósforo, sódio, magnésio e cálcio), pelo que é uma espécie de elevada qualidade nutricional e de grande importância na dieta alimentar humana (Borges et al., 2009).

1.4.1. Importância em aquacultura

O linguado do Senegal é uma espécie muito apreciada no sul da Europa, sendo considerada importante para a aquacultura marinha devido ao seu elevado interesse comercial (Asensio et al., 2009). Nos últimos anos, a produção desta espécie tem-se intensificado ao longo da costa sul da Europa, nomeadamente em Portugal e Espanha, visto que se adapta melhor às águas mais quentes dos climas temperados (Figura 1.8; Borges, 2015; Fernández, 2012).

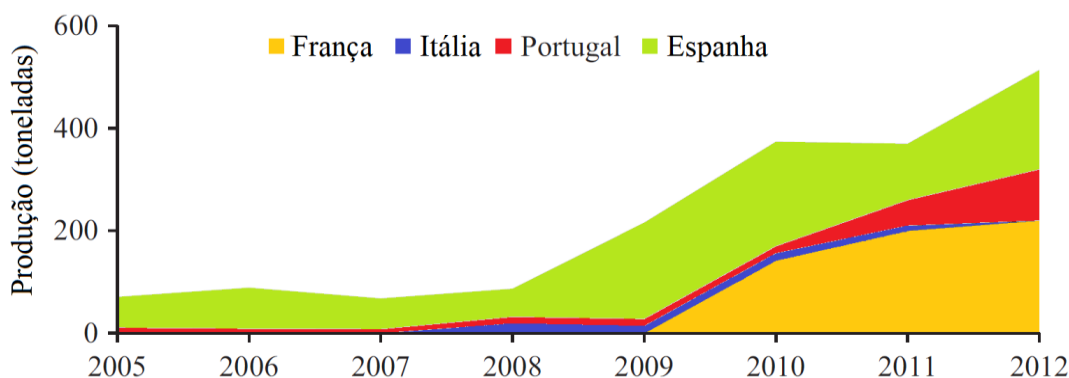


Figura 1.8. Evolução da produção (toneladas) do linguado *Solea senegalensis* em aquacultura na Europa, entre 2005-2012. Adaptado de: Morais et al. (2014).

Em Portugal, a produção de linguado em aquacultura terá recorrido inicialmente ao regime extensivo com utilização de tanques de terra batida (Dinis e Sarasquete, 1999; Dinis et al., 1999). Contudo, atualmente a produção por regime intensivo em Portugal terá já ultrapassado os valores de produção relativos ao regime extensivo (INE, 2018). Enquanto o sistema extensivo aproveita exclusivamente as condições naturais disponíveis, inclusive o alimento, no sistema intensivo utilizam-se grandes densidades de pescado, em tanques sintéticos (de fibra e betão), onde os parâmetros de produção são controlados rigorosamente, e o alimento é fornecido sob forma de ração (Morais et al., 2014). Mais recentemente, os sistemas de recirculação de aquacultura (RAS) foram implementados e a grande maioria das produções em Portugal e Espanha utilizam este tipo de sistema para um melhor controlo dos parâmetros da água. Este foi um importante desenvolvimento tecnológico, que resultou no aumento da produção, já que o meio natural é muito sensível às mudanças ambientais (Morais et al., 2014). Além do elevado valor de mercado do linguado, a desova natural de reprodutores mantidos em cativeiro, o desenvolvimento rápido de ovos e larvas e a elevada taxa de crescimento exibida pelos juvenis são algumas das vantagens associadas à produção desta espécie em aquacultura (Fernández et al., 2009). Deste modo, a elevada procura e o elevado valor de mercado (17 euros/kg), tornam o linguado numa espécie de grande interesse comercial, permitindo diversificar também a produção de espécies mediterrânicas em aquacultura (Borges et al., 2013; Fernández, 2012). A introdução desta espécie na aquacultura parece assim ser promissora, especialmente devido à necessidade de desenvolver mercados rentáveis (Batista et al., 2016; Borges et al., 2009).

No entanto, existem alguns problemas que limitam a expansão em aquacultura de peixes chatos como o linguado, tais como: a suscetibilidade a patologias (*p.e.* fotobacteriose, flexibacteriose, vibriose), o desmame dos juvenis, as diferenças individuais durante a fase de crescimento e o controlo da reprodução (Borges et al., 2009; Norambuena et al., 2016). Estes peixes estão em constante interação com bactérias presentes no meio e nos alimentos. Nos tanques de aquacultura, as condições de criação podem aumentar a proliferação de bactérias oportunistas que podem causar doenças (*p.e.* aglomeração, más condições de manipulação, dietas desequilibradas; Makridis et al., 2005). Outro problema associado à produção de linguados é que estes peixes são altamente suscetíveis a anomalias vertebrais, quer em condições normais quer em condições experimentais. Pensa-se que a origem deste problema advenha de alterações ambientais, nutricionais e genéticas, no entanto, não há informação suficiente sobre os mecanismos envolvidos nestas deformações do esqueleto. Estas deformações ósseas não só têm implicações no bem-estar animal, como também levam a perdas económicas, na medida em que levam à diminuição do valor de mercado e degradam o produto final (Azevedo et al., 2018).

1.5. Objetivos

Conforme anteriormente descrito, as alterações climáticas têm-se evidenciado nas últimas décadas e constituem uma das maiores ameaças ambientais, sociais e económicas. Particularmente, no caso dos ecossistemas aquáticos, as alterações climáticas podem ter como consequências o aumento da temperatura e da salinidade da água e a diminuição do pH e da concentração de oxigénio dissolvido. Estas alterações podem implicar modificações na qualidade nutricional do pescado assim como dos perigos associados ao seu consumo. Desta forma, é de extrema importância investigar os impactos das alterações climáticas na qualidade nutricional do pescado, assim como na segurança alimentar e saúde pública, de modo a garantir que os consumidores tenham acesso a alimentos com elevado valor nutricional nos “oceanos do futuro”.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar os efeitos interativos e isolados do aquecimento (ΔT °C=+4 °C) e da acidificação ($\Delta pCO_2 \sim +500 \mu atm$, equivalente a $\Delta pH=-0,3$ unidades) da água do mar na qualidade nutricional (composição química aproximada, perfil de ácidos gordos e mineral) do pescado, usando o linguado branco (*Solea senegalensis*) como modelo biológico devido ao seu elevado valor comercial em Portugal.

Material e Métodos

2.1. Delineamento Experimental

2.1.1. Aclimação dos organismos em estudo

Para este ensaio, adquiriram-se linguados juvenis (*Solea senegalensis*) do mesmo lote e com características biométricas semelhantes (peso total: $25,39 \pm 2,56$ g, comprimento total: $12,78 \pm 0,76$ cm) produzidos na Estação Piloto de Piscicultura em Olhão do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (EPPO-IPMA, Olhão). Os peixes foram transportados em contentores térmicos com oxigénio puro, de modo a manter níveis de 5 mg/L e temperatura da água a 19 °C, da EPPO-IPMA para o Laboratório Marítimo da Guia (LMG, MARE-FCUL, Cascais). Após a chegada ao LMG, os linguados foram distribuídos aleatoriamente por 12 aquários de incubação (98x33x24,7 cm; cada aquário com uma capacidade total de 100 L), cada um com um sistema de recirculação de aquacultura (RAS) independente. Cada RAS encontrava-se equipado com: i) sistema de filtração biológica (modelo FSBF 1500, TMC Iberia, Portugal); ii) sistema de filtração mecânica (lã de vidro e escumador de proteínas; ReefSkimPro, TMC-Iberia, Portugal); iii) sistema de desinfecção da água por luz UV (Vecton 300, TMC Iberia, Portugal); iv) temperatura controlada independente e automaticamente (Frimar, Fernando Ribeiro Lda, Portugal); e v) controlo de pH (Profilux 3,1 N, GHL, Alemanha) através de sistema de válvulas solenoides. Em cada sistema de incubação ($n=12$), o pH da água foi monitorizado a cada 2 s, através de elétrodos de pH, os quais estavam conectados a um sistema informatizado Profilux 3.0. Os valores de pH foram automaticamente ajustados, ora diminuindo os níveis através de injeção de CO₂ (Air Liquide, Portugal) ora aumentando os níveis através de arejamento com ar filtrado (CO₂ retirado e absorvido utilizando o sistema de “soda lime”; Sigma-Aldrich). A água do mar utilizada no sistema RAS foi filtrada (0,35 µm) e esterilizada por luz UV (Vecton 600, TMC Iberia, Portugal). Diariamente, efetuou-se a monitorização dos parâmetros físico-químicos da água de cada aquário (temperatura, pH, salinidade e oxigénio dissolvido) e verificou-se a exatidão dos valores de temperatura e pH fornecidos pelo sistema de Profilux, utilizando, para tal, um termómetro digital (Ebro, TFX 430 Pt100, Alemanha) e um equipamento multi-parâmetros (Multi 3420 SET G, WTW, Alemanha). Os níveis de amónia (NH₃/NH₄⁺), nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻) foram monitorizados regularmente através de testes colorimétricos (Tropic Marin, EUA) e mantidos abaixo de 0,05 mg/L, 0,20 mg/L e 2,0 mg/L, respetivamente, de modo a garantir uma boa qualidade da água. De modo a não causar *stress* fisiológico aos animais devido à elevada densidade populacional, a densidade de linguados foi mantida inferior a 5 g de peso corporal por litro de água em cada aquário de

incubação. Diariamente, a mortalidade também foi registada em cada tratamento/aquário, a água do mar foi parcialmente substituída (cerca de 20%) e as fezes dos peixes foram removidas de cada aquário de modo a assegurar a qualidade da água. De acordo com a metodologia descrita por Sarazin (1999), a alcalinidade total da água do mar foi determinada semanalmente em todos os aquários, e em combinação com o pH da água calcularam-se os parâmetros do sistema de carbonato.

Antes de se iniciar o ensaio, os animais foram submetidos a um período de aclimação às condições de laboratório com a duração de um mês. Durante este período, as condições abióticas mantidas nos aquários foram as seguintes: oxigénio dissolvido (OD) acima de 5 mg/L; $T=19,0\pm0,4$ °C; $pH=8,06\pm0,10$; salinidade= $35\pm1\%$ e um fotoperíodo de 12h de iluminação e 12h de escuridão. De modo a minimizar o *stress* e permitir que os peixes se pudessem aclimatar às condições experimentais, uma semana antes de se ter simulado os cenários de exposição às alterações climáticas, a temperatura da água do mar foi lentamente aumentada (1 °C por dia) e o pH foi lentamente diminuído (-0,1 unidades de pH por dia) até atingir 23 °C e ~ 1000 μatm $p\text{CO}_2$ (equivalente a $pH=7,7$ unidades) nos aquários em que se simulou as condições de aquecimento e acidificação, respetivamente, de acordo com as projeções do Painel Intergovernamental para as Mudanças Climáticas (cenário RCP 8.5; IPCC, 2014; McNeil e Sasse, 2016).

2.1.2. Exposição aos cenários de aquecimento e acidificação dos oceanos

Após o período de aclimação, os linguados foram expostos durante 61 dias a quatro tratamentos experimentais com o objetivo de compreender as potenciais consequências dos organismos às condições atuais e futuras esperadas para o ano de 2100 [isto é, aquecimento (ΔT °C=+4 °C) e acidificação da água do mar ($\Delta pH=-0,3$ unidades), de acordo com as projeções do IPCC (2014); Figura 2.1]:

i. Controlo – Temperatura da água do mar a 19 °C (mantidos a $18,9\pm0,4$ °C) e pH a 8,0 (mantidos a $8,02\pm0,07$; $p\text{CO}_2\sim 531,90\pm154,51$ μatm), sendo estas as condições atuais usualmente aplicadas no cultivo de linguados juvenis em Portugal;

ii. Aquecimento - Temperatura da água do mar a 23 °C (mantidos a $23,0\pm0,3$ °C) e pH a 8,0 (mantidos a $8,07\pm0,06$; $p\text{CO}_2\sim 445,91\pm128,27$ μatm);

iii. Acidificação - Temperatura da água do mar a 19 °C (mantidos a $19,1\pm0,4$ °C) e pH a 7,7 (mantidos a $7,71\pm0,06$; $p\text{CO}_2\sim 1013,03\pm321,95$ μatm);

iv. Aquecimento e Acidificação - Temperatura da água do mar a 23 °C (mantidos a $22,9\pm0,3$ °C) e pH a 7,7 (mantidos a $7,66\pm0,10$; $p\text{CO}_2\sim 981,84\pm302,64$ μatm).

Cada tratamento incluiu três aquários/replicados independentes ($n=4$ animais por aquário/replicado, isto é, 12 animais por tratamento; Figura 2.1).

Durante o período experimental, os linguados foram alimentados com 3% do seu peso corporal médio (dividido em duas refeições por dia). A ração (pellets inertes secos) fornecida aos linguados foi fabricada por uma empresa especializada em produção de rações (SPAROS Lda, Olhão, Portugal), considerando os requisitos nutricionais para o linguado juvenil (Anexo I). A quantidade de ração fornecida aos peixes foi ajustada semanalmente de acordo com o peso dos animais e biomassa em cada aquário.

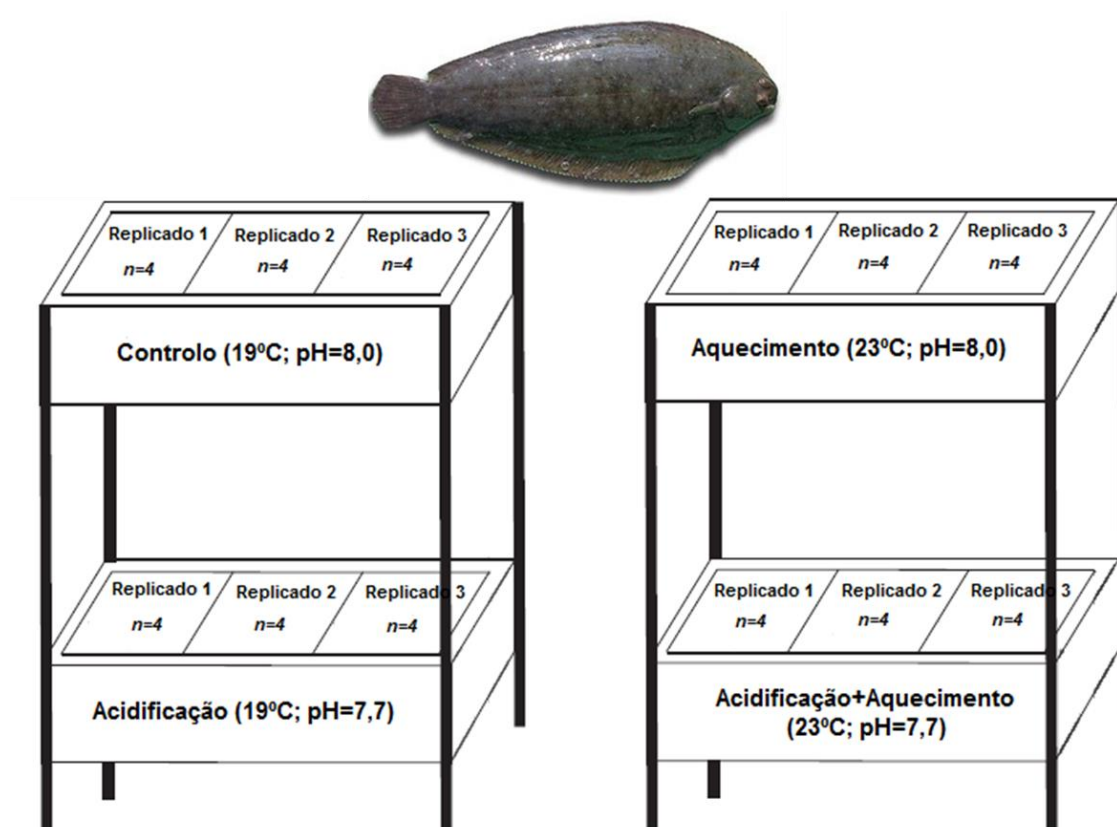


Figura 2.1. Desenho experimental.

No início da experiência, foram recolhidos aleatoriamente quatro peixes e após 61 dias de ensaio, foram recolhidos quatro peixes de cada tratamento. Os peixes foram imediatamente eutanasiados por imersão durante 10 minutos numa solução saturada de metanosulfonato de tricáina (2000 mg/L de MS-222; Sigma-Aldrich, EUA) tamponada com bicarbonato de sódio (NaHCO_3 ; Sigma-Aldrich, EUA) usando uma proporção de 1:1. Em seguida realizou-se uma incisão na região dorsal imediatamente posterior à cabeça para cortar a coluna vertebral, assegurando a perda imediata de sensibilidade (CE, 2010), de forma a reduzir o *stress* e o sofrimento animal e seguindo as boas práticas eticamente recomendadas. Os ensaios efetuados com os peixes foram aprovados pelo Comité de Ética da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ORBEA) e realizados de acordo com os regulamentos legais (Diretiva 2010/63 da UE). Os dados biométricos (comprimento total, peso total) foram também registados no início e fim da experiência (T_0 e T_{61} , respetivamente) e o peixe foi dissecado, tendo-se recolhido o músculo (sem pele e espinhas), e pesado o fígado e restantes vísceras. O músculo de cada indivíduo foi armazenado num saco plástico previamente identificado e imediatamente congelado a -80°C . Para determinação dos índices fisiológicos do peixe, nomeadamente o índice hepatossomático (HSI) e o índice viscerossomático (VSI), foram recolhidos o fígado e as vísceras, respetivamente, de modo também a fornecer informações sobre a condição destes órgãos. Para tal, utilizaram-se as seguintes fórmulas (Anacleto et al., 2018):

$$HSI (\%) = \frac{\text{peso húmido do fígado (g)}}{\text{peso total do peixe húmido (g)}} \times 100$$

$$VSI (\%) = \frac{\text{peso húmido das vísceras (g)}}{\text{peso total do peixe húmido (g)}} \times 100$$

Além disso, foi também calculado o índice de condição de Fulton (K) baseado na relação peso-comprimento para se determinar a condição fisiológica dos peixes, de acordo com a seguinte fórmula (Ricker, 1975):

$$K = \frac{100 \times \text{peso total peixe húmido (g)}}{\text{comprimento total}^3}$$

Por fim, foi calculada a taxa de crescimento relativa (TCR, %) e a taxa de crescimento específica em termos de proteína (TCEp, %/dia), as quais podem ser obtidas utilizando as seguintes equações (Fang et al., 2010):

$$TCR (\%) = \frac{\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100$$

$$TCEp \left(\frac{\%}{\text{dia}} \right) = \frac{\ln(PR_{\text{final}}) - \ln(PR_{\text{inicial}})}{t} \times 100$$

Onde, PR_{final} é o teor de proteína final (em g/100g), PR_{inicial} é o teor de proteína inicial (em g/100g) e t é o tempo de duração da experiência (em dias).

No final, as amostras foram congeladas a -80 °C e posteriormente liofilizadas durante 48h, a -50 °C e a baixa pressão sob vácuo (aproximadamente 10^{-1} atm; Power Dry 150 LL3000, Heto, República Checa), sendo de seguida homogeneizadas e mantidas a -80 °C até análises posteriores.

2.2. Metodologias analíticas

2.2.1. Alcalinidade

A alcalinidade total da água do mar foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Sarazin et al. (1999), e a combinação da alcalinidade total (AT), pH, temperatura e salinidade foi usada para calcular os parâmetros do sistema de carbonato [carbono total (CT), pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), concentração de bicarbonato (HCO_3^-) e estado de saturação da aragonite e calcite (Ω_{Arg} e Ω_{Cal} , respetivamente)].

Equipamentos e utensílios

- ❖ Balança de precisão (Ohaus, Pioneer Precision),
- ❖ Espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800; Figura 2.2),
- ❖ Vórtex (Fisher Scientific, TopMix FB 15024),
- ❖ Filtros 0,45µm.

Reagentes

- ❖ Água do mar artificial [cloreto de sódio 0,7 M (NaCl , Merck, Alemanha, 99%) + cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Alemanha, 98%) + cloreto de potássio (KCl , Sigma-Aldrich, Alemanha, 99%) + sulfato de sódio (Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich, Alemanha, 99%)],
- ❖ Bicarbonato de sódio 0,1 M (NaHCO_3 , Sigma-Aldrich, Alemanha, 99,5%),
- ❖ Reagente “colored” [ácido fórmico 0,1 M (Sigma-Aldrich, Alemanha, 95%) + azul de bromofenol (Roth, Alemanha) + cloreto de sódio 0,7 M (Merck, Alemanha, 99%)].



Figura 2.2. Espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão).

Preparação das soluções padrão:

De forma a traçar a curva de calibração foram preparadas as soluções padrão nas concentrações entre 1,5 mM e 6,0 mM, utilizando-se as soluções de NaHCO₃ e água salgada artificial. A cada padrão, foi adicionada igual quantidade de reagente “colored” e após agitação no vórtex, foi medida a absorvância a 595 nm num espectrofotômetro.

Processo Analítico:

Recolheram-se amostras de água de cada aquário, em duplicado, e após serem filtradas por filtros com poro de 0,45 µm, foi adicionada igual quantidade de reagente “colored”. Tal como descrito para os padrões, procedeu-se também à leitura das absorvâncias a 595 nm das amostras. A determinação da alcalinidade foi feita em duplicado para cada aquário/replicado de cada tratamento (n=3x2). O Anexo II contém os resultados obtidos para cada um dos tratamentos da experiência relativos à alcalinidade total e para cada um dos parâmetros do sistema do carbonato.

2.2.2. Composição química aproximada

Determinaram-se os teores de humidade, cinza, proteína bruta e gordura livre de acordo com os métodos de referência descritos em AOAC (2005).

2.2.2.1. Humidade

A determinação da humidade foi realizada de acordo com a norma NP 2282 (IPQ, 2009a).

Equipamentos e utensílios

- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo; Alemanha),
- ❖ Estufa (100±5 °C; Cassel),
- ❖ Exsicador,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Processo analítico:

Pesou-se cerca de 5,0±0,001 g de amostra húmida, para um cristalizador de vidro previamente tarado e secou-se em estufa a 100±5 °C durante 24h. De seguida, retirou-se da estufa e arrefeceu-se em exsicador. Após o arrefecimento a amostra foi pesada, e este processo foi repetido até obtenção de peso constante. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Resultados:

Para obtenção do teor de humidade, expressa em grama por 100 g de amostra, utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{\text{Peso cristalizador + amostra seca (g)} - \text{Peso cristalizador}}{\text{Peso amostra húmida (g)}} \times 100$$

2.2.2.2. Cinza

O teor de cinza total foi determinado baseado no método descrito na NP 2032 (IPQ, 2009b).

Equipamento e utensílios:

- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo; Alemanha),
- ❖ Estufa (105±2 °C; Cassel),
- ❖ Mufla (Heraeus, tipo MR 170E),
- ❖ Placa de aquecimento (Schott-Geräte, CK 111),
- ❖ Cadinhos de porcelana,
- ❖ Exsicador,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Processo analítico:

Para a determinação da cinza, pesaram-se 2,0±0,001 g de amostra liofilizada para um cadinho previamente tarado. Colocou-se o cadinho na estufa, para secagem da amostra durante uma noite. De seguida, colocou-se o cadinho à mufla previamente aquecida a 150 °C, e elevou-se a temperatura lentamente até atingir 500±25 °C. Deixaram-se os cadinhos na mufla durante 16h para incineração. Retirou-se da mufla, deixou-se arrefecer em exsicador e pesou-se. Repetiu-se as operações de incineração, arrefecimento e pesagem até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 1 mg. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Resultados:

Para o cálculo do teor de cinzas utilizou-se a expressão:

$$\text{Teor de cinza (\%)} = \frac{\text{Peso cadinho + cinza (g)} - \text{Peso cadinho (g)}}{\text{Peso cadinho + amostra (g)} - \text{Peso cadinho (g)}} \times 100$$

2.2.2.3. Proteína Bruta

O método de determinação do teor de proteína bruta foi baseado na NP 4488 (IPQ, 2009c), através de quantificação do azoto total pelo método de Kjeldahl e convertendo este valor em proteína bruta considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica. Este método consiste numa hidrólise em meio ácido das amostras e posterior quantificação do teor de azoto total por destilação e titulação, usando um fator de conversão de 6,25, isto porque muitas das proteínas contêm cerca de 16% de azoto (Adrian et al., 2000).

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Digestor de azoto (Tecator 2006),
- ❖ Unidade destiladora (Kjeltec System 1002 Distilling Unit Tecator; Figura 2.3),
- ❖ Placa de agitação (P Selecta, Espanha),
- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo AB204),
- ❖ Tubos de Kjeldahl para a digestão,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Reagentes:

- ❖ Hidróxido de Sódio (NaOH, Merck, Alemanha),
- ❖ Ácido Bórico 99,8% (H₃BO₃, Merck, Alemanha),
- ❖ Ácido Sulfúrico concentrado (H₂SO₄, Merck, Alemanha),
- ❖ Solução indicadora de ácido bórico (0,2 g de vermelho de metilo em 100 mL de etanol 95% + 0,1 g de azul de metileno em 50 mL de etanol 95%),
- ❖ Mistura catalisadora (mistura de selênio e sulfato de potássio na proporção de 1:100 (m/m),
- ❖ Solução alcoólica de fenolftaleína.



Figura 2.3. Unidade destiladora (Kjeltec System 1002 Distilling Unit Tecator).

Processo analítico:

Pesou-se para um papel de filtro cerca de 0,500±0,001 g de amostra liofilizada (músculo) e colocou-se num tubo de digestão. Adicionou-se uma porção de mistura catalisadora e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (95-97%). Aqueceu-se em digestor a 360 °C até a amostra ficar transparente. O digerido foi filtrado para balões volumétricos de 100 mL que foram aferidos com água milli-Q. Em seguida, 50 mL da amostra foi alcalinizada a pH 8 com hidróxido de sódio 6 M, utilizando a fenolftaleína como indicador, e destilada por arrastamento de vapor (Kjeltec System 1002 Distilling Unit Tecator), tendo o destilado sido recolhido numa solução de ácido bórico (20 g/L), sendo os boratos posteriormente doseados por titulação com ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,020N) e registou-se o volume no final. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Resultados:

De modo a calcular o teor de proteína bruta, utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Teor de Proteína Bruta (\%)} = \frac{V_1 \times N \times b_1}{V_2 \times m_2} \times 1,4 \times 6,25$$

Onde, **V₁** é o volume de H₂SO₄ 0,020 N gasto na titulação (mL), **V₂** é o volume de amostra digerida utilizado na destilação (mL), **b₁** é o volume do balão volumétrico onde ficou reservado o digerido (mL), **N** é a normalidade do titulante e **m₁** é a massa de amostra liofilizada utilizada na digestão (g).

2.2.2.4. Gordura livre total

O teor de gordura livre total foi determinado de acordo com o procedimento descrito na NP 1972 (IPQ, 2009d), utilizando-se o método de extração de *Soxhlet*. Este método de quantificação de gordura baseia-se na extração da matéria gorda de uma amostra húmida, efetuando-se várias lavagens sob refluxo com solvente (éter etílico). De seguida, os solventes são eliminados por evaporação, secagem.

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Aparelho de *Soxhlet* (P Selecta, Espanha; Figura 2.4),
- ❖ Estufa elétrica universal (103 ± 2 °C; Memmert, Alemanha),
- ❖ Placa de aquecimento (P Selecta, Espanha),
- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo; Alemanha),
- ❖ Papel de filtro,
- ❖ Exsicador,
- ❖ Almofariz,
- ❖ Extratores,
- ❖ Balões (150 mL),
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Reagentes:

- ❖ Éter etílico (98%, Alfa Aesar),
- ❖ Sulfato de sódio anidro (99,9% m/m; Panreac).

Processo analítico:

Pesaram-se $2,0\pm 0,001$ g de amostra liofilizada (músculo) para um almofariz, previamente identificado e tarado, e adicionou-se sulfato de sódio anidro, de forma a extrair alguma água existente na amostra. De seguida, transferiu-se a amostra para um papel de filtro e envolveu-se todo o material biológico, introduzindo-se em seguida o cartucho de extração no extrator de *Soxhlet*. Previamente, os balões de fundo raso foram secos numa estufa a 103 ± 2 °C durante 30 minutos para eliminar a humidade existente. Após arrefecimento em exsicador, pesagem e identificação dos balões, colocou-se 80 mL de éter etílico e conectou-se ao extrator contendo o cartucho de extração. Adicionalmente, colocou-se uma quantidade de éter etílico até cobrir completamente o cartucho no extrator. Cada conjunto, contendo um extrator e um balão, foi colocado num aparelho de *Soxhlet*, no qual permaneceu em placa de aquecimento durante um período de 7 horas. No final deste tempo, extraiu-se o éter etílico por evaporação numa placa de aquecimento e secaram-se os balões numa estufa a 103 ± 2 °C durante 30 minutos. Transferiram-se os balões com gordura para um exsicador onde se deixou arrefecer até à temperatura ambiente e pesou-se, registando o valor de seguida. Repetiu-se este passo até se atingir um peso constante. Cada amostra foi analisada em triplicado.



Figura 2.4. Aparelho de Soxhlet (P Selecta, Espanha).

Resultados:

De modo a calcular o teor de gordura livre, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{\text{Peso do bal\~ao} + \text{gordura (g)} - \text{Peso do bal\~ao (g)}}{\text{Peso da amostra liofilizada (g)}} \times 100$$

2.2.2.5. Glicogénio

As concentrações de glicogénio nas amostras foram determinadas colorimetricamente usando uma solução de antrona-ácido sulfúrico pelo método descrito por Viles e Silverman (1949) e Leyva et al. (2008).

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo, AG 204),
- ❖ Centrífuga (Hettich, Universal 30F),
- ❖ Placa de agitação (P Selecta, Espanha),
- ❖ Banho de aquecimento (Mettmert, Alemanha),
- ❖ Vórtex (HeiDolph Reax 2000, Alemanha),
- ❖ Espectrofotómetro (UNICAM UV-vis, Heλios, Reino Unido),
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Reagentes:

- ❖ Água ultrapura (Milli-Q),
- ❖ Hidróxido de Potássio 33% (Alfa Aesar, Alemanha),
- ❖ Glicogénio (Sigma-Aldrich, Alemanha),
- ❖ Ácido Sulfúrico concentrado (95-98%, Sigma-Aldrich, Alemanha),
- ❖ Sulfato de Sódio anidro (99,9% m/m; Panreac, Espanha),
- ❖ Etanol 96% (Alfa Aesar, Alemanha),
- ❖ Antrona (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Preparação das soluções-padrão:

A solução padrão de glicogénio (1 mg/mL) foi preparada pesando-se 10 mg de glicogénio e perfazendo um balão de 10 mL com água milli-Q. As soluções-padrão utilizadas para a curva de calibração foram preparadas para as concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 µg/mL.

Preparação da solução de antrona:

Para 10 tubos, pesou-se 0,075 g de antrona, adicionando-se de seguida 15 mL de água milli-Q. Por último adicionou-se 38 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando-se numa placa de agitação e em banho de gelo.

Processo analítico:

Hidrolisou-se a amostra liofilizada $0,025 \pm 0,0001$ g com 15 mL de hidróxido de potássio a 33% durante 15 minutos, agitando-se as amostras regularmente. Após arrefecimento até temperatura ambiente, transferiram-se 0,5 mL de cada solução para um novo tubo. Adicionou-se 50 µL de uma solução saturada de sulfato de sódio anidro e 2 mL de etanol e colocou-se em banho de gelo, durante 30 minutos, para precipitação do glicogénio. Após centrifugação (durante 8 minutos a 9000 rpm), decantou-se o sobrenadante e redissolveu-se o precipitado em 0,5 mL de água milli-Q, adicionando-se de seguida 1 mL de etanol. Deixou-se novamente em banho de gelo durante 30 minutos, e posteriormente, centrifugou-se durante 10 minutos a 9000 rpm. Decantou-se o sobrenadante e redissolveu-se o precipitado em 0,4 mL de água milli-Q. Fez-se reagir o glicogénio precipitado adicionando-se 3 mL de reagente de antrona, em banho de água a 90°C, durante 20 minutos. Mediu-se a absorvância do complexo glicogénio-antrona a 620 nm num espectrofotómetro. Preparou-se uma curva de calibração usando glicogénio como padrão. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Resultados:

O teor de glicogénio foi expresso em g/100 g de músculo, e em base húmida, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Teor de Glicogénio (\%)} = \frac{(C \times 15 \times 0,4 \times 100)}{0,5 \times 1000 \times m} \times \frac{100}{100 - H}$$

Onde, **C** é a concentração em µg/mL obtida a partir da curva de calibração, **m** é a massa inicial (g), e **H** é o teor de humidade da amostra.

2.2.2.6. Energia

A partir do teor de lípidos, proteína e glicogénio, foi calculada a energia contida nos compostos orgânicos que constituem o organismo. Deste modo, a energia total foi calculada de acordo com os fatores de conversão de Gnaiger (1983) usando a seguinte equação:

$$E \text{ (kJ/g)} = \frac{(39,5 \times Lip) + (24,0 \times Prot) + (17,5 \times Glic)}{1000}$$

Onde, **E** é a energia total em kJ por grama de peso seco, **Lip** é o teor de lípidos em mg/g de peso seco, **Prot** é o teor de proteína em mg/g de peso seco e **Glic** é o teor de glicogénio em

mg/g de peso seco. Os resultados foram posteriormente convertidos em peso húmido com base no valor obtido para a humidade.

2.2.3. Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado com base no método proposto por Bondia-Pons et al. (2007), por cromatografia de fase gasosa com coluna capilar. Este método consiste numa transesterificação, onde os ácidos gordos dos triacilgliceróis das amostras são convertidos em ésteres metílicos, utilizando-se metanol para remoção do glicerol.

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Cromatógrafo de fase gasosa equipado com um detetor de ionização de chama (GC-FID; Shimadzu GC-2010, Kyoto, Japão),
- ❖ Auto-injetor Shimadzu AOC-20i,
- ❖ Coluna capilar de sílica fundida (CP-Sil 88; 60 m de comprimento x 0,25 mm diâmetro interno, espessura do filme de 0,20 µm; Agilent J&W, USA),
- ❖ Hélio (gás de arraste; Linde Sógas, pureza ≥ 99,999%)
- ❖ Balança de precisão (Ohaus, Pioneer Precision),
- ❖ Tubos de vidro de rosca,
- ❖ Vórtex (Fisher Scientific, TopMix FB 15024),
- ❖ Vials,
- ❖ Banho de aquecimento (Mettler, Alemanha),
- ❖ Centrífuga (Hettich, Universal 30F),
- ❖ Evaporador a azoto,
- ❖ Evaporador rotativo (Rotavapor® R-200, Buchi, Flawil, Suíça),
- ❖ Tubos de vidro,
- ❖ Exsiccador,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Reagentes:

- ❖ Solução de Folch (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.),
- ❖ Cloreto de sódio (99,5%, Panreac),
- ❖ Sulfato de sódio anidro (PA, Pronalab),
- ❖ n-hexano (99%, Merck, Alemanha),
- ❖ Mistura de padrões de ácidos gordos (Sigma 47, 885-U Supelco 37 FAME Mix, Bellefonte, EUA),
- ❖ Metóxido de sódio (NaOMe; Merck, Alemanha),
- ❖ Trifluoreto de boro em metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.),
- ❖ Metanol (VWR Chemicals Prolabo),
- ❖ Hidróxido de sódio (Pronalab),
- ❖ Ácido eicosanóico (C21:0; ≥ 98%, Sigma-Aldrich),
- ❖ Hidroxitolueno butilado (BHT ≥ 99%, Sigma-Aldrich).

Processo de extração de lípidos e catálise:

Os lípidos foram previamente extraídos pelo método de Folch (1957) com a finalidade do resíduo lipídico ser utilizado para fazer a derivatização através da catálise básica. Neste método de Folch, inicialmente pesou-se cerca de 0,5 g de músculo liofilizado e adicionou-se 20 mL de solução de Folch. Após 15 minutos de agitação no vórtex, a amostra foi centrifugada durante 10

minutos a 2500 rpm. Filtrou-se a solução em papel Whatman para outro tubo. A extração foi repetida com a fração sólida, com o extrato lipídico filtrado em cerca de 40 mL. Adicionou-se cloreto de sódio a 0,73% (8 mL) e centrifugou-se o extrato durante 15 minutos a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e transferiu-se a camada inferior para um tubo de vidro previamente pesado e evaporou-se o solvente num evaporador rotativo (Rotavapor® R-200, Buchi, Flawil, Suíça) a 45 °C com vácuo. Após 24h de secagem, pesou-se o tubo e calculou-se o teor de lípidos da amostra (% de lípidos, expresso em g de lípidos por 100 g de amostra) através da diferença entre as massas inicial e final dos tubos de evaporação.

Posteriormente, procedeu-se à catálise básica, em que os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) foram determinados por transmetilação catalisada dos lípidos totais utilizando metóxido de sódio (dador de metilos) e trifluoreto de boro (funciona como catalisador da reação de esterificação). Deste modo, o resíduo lipídico obtido anteriormente pelo método de Folch foi rediluído em 3 mL de n-hexano. A 1,5 mL destes extraídos diluídos, adicionaram-se 5 mL de solução de metóxido de sódio (NaOMe) a 0,5 M. Adicionou-se também 100 µL do padrão interno C21:0 a 2,5 mg/mL a cada amostra. Após agitação em vórtex, colocaram-se as amostras num banho quente a 100 °C durante 10 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se às amostras 5 mL de trifluoreto de boro em metanol, e posteriormente as amostras foram novamente aquecidas a 100 °C durante 30 min, seguindo-se um rápido arrefecimento. De seguida, adicionou-se 1 mL de n-hexano com hidroxitolueno butilado (BHT) a 0,02%. Posteriormente, os tubos foram agitados em vórtex, adicionou-se 2 mL de cloreto de sódio e centrifugou-se durante 10 minutos a 2200 rpm. Recuperou-se a camada superior e secou-se com sulfato de sódio anidro. Retiraram-se 150 µL para um vial, evaporou-se com azoto até à secura e, finalmente, dissolveu-se em 1100 µL de n-hexano, para injetar e analisar num cromatógrafo de fase gasosa equipado com um detetor de ionização de chama (GC-FID).

Processo analítico:

Os FAME foram analisados no GC-FID equipado com um auto-injetor. A separação foi realizada numa coluna capilar (CP-Sil 88; 60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de filme). As condições do programa foram as seguintes: i) o injetor *split-splitless* foi usado em modo *split* com uma razão de 1:10; ii) o volume de injeção da amostra foi de 1,5 µL; iii) as temperaturas do injetor e do detetor foram mantidas a 250 e 260 °C, respetivamente; iv) foi usado um fluxo de 30 mL/min de hélio como gás de arraste, 40 mL/min de hidrogénio e 400 mL/min de ar; e v) o gradiente térmico foi de 100 °C durante 5 minutos, em seguida aumentou-se 1 °C/min até se atingir 215 °C, onde a mesma temperatura foi mantida durante 12 minutos. Os FAME foram identificados e quantificados por comparação dos tempos de retenção com os de uma mistura de padrões (FAME 37 – mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos) e por adição de padrão interno (21:0) às amostras para converter a percentagem de cada ácido gordo em mg/g, através da utilização do *software GC solution* para sistemas GC (Shimadzu).

Os resultados foram expressos em relação ao total de ácidos gordos (% de área relativa).

Resultados:

Os valores percentuais obtidos para cada ácido gordo presente nas amostras analisadas foram, posteriormente, convertidos em valor absoluto (mg/100 g) com base na seguinte equação:

$$AG = \frac{\text{área FA} \times \text{massa do PI (mg)}}{\text{área PI} \times \text{massa amostra (g)}}$$

Onde, **FA** é o ácido gordo correspondente e **PI** é o padrão interno (21:0).

De forma a avaliar possíveis riscos para a saúde humana, foram também calculados os índices de aterogenicidade e trombogenicidade (IA e IT, respetivamente). Estes índices são ferramentas matemáticas importantes do ponto de vista do consumidor, pois permitem avaliar o valor nutricional nos diferentes cenários de exposição às alterações climáticas. Estes índices também permitem estimar a probabilidade de desenvolvimento de doenças coronárias, uma vez que alguns ácidos gordos estão envolvidos nos processos pró- ou anti-inflamatórios do sistema cardiovascular. Para a determinação destes índices IA e IT foram utilizadas as seguintes expressões propostas por Ulbricht e Southgate (1991):

$$IA = \frac{(12:0) + (4 \times 14:0) + (16:0)}{\Sigma MUFA + \Sigma PUFA (\omega 6 + \omega 3)}$$

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{(0,5 \times \Sigma MUFA) + (0,5 \times \Sigma \omega 6) + (3 \times \Sigma \omega 3) + (\Sigma \omega 3 / \Sigma \omega 6)}$$

Também se calculou o índice hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (h/H) em que se utilizou a seguinte fórmula proposta por Santos-Silva et al. (2002):

$$\frac{h}{H} = \frac{(18:1n - 9 + 18:2n - 6 + 20:4n - 6 + 18:3n - 3 + 20:5n - 3 + 22:5n - 3 + 22:6n - 3)}{(14:0 + 16:0)}$$

Onde, **ΣMUFA** é o somatório dos ácidos gordos monoinsaturados, **Σω3** é o somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família ómega-3, e **Σω6** é o somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família ómega-6.

2.2.4. Teor de Minerais

2.2.4.1. Quantificação de macro (K, Na e Mg) e microelementos (Zn, Fe, Cu e Mn) essenciais

A quantificação de elementos essenciais, nomeadamente os macro [potássio (K), sódio (Na) e magnésio (Mg)] e microelementos [zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu) e manganês (Mn)] foi efetuada pelo método espectrofotométrico de absorção atómica de chama, baseado na metodologia proposta por Jorhem (2000).

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo, AG 204),
- ❖ Estufa, regulável a 100 ± 5 °C (Memmert, ULE 500),
- ❖ Mufla regulável a 500 ± 25 °C (Heraeus, tipo MR 170 E),
- ❖ Placa elétrica (Schott-Geräte, CK 111),
- ❖ Filtros (Macherey-Nagel 640 w, $\varnothing=70$ cm),
- ❖ Espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, Spectr AA 55B). A chama utilizada foi de ar-acetileno para todos os metais (Figura 2.5),
- ❖ Lâmpadas de cátodo-oco (Varian) para leitura do potássio, sódio, magnésio, zinco, ferro, cobre e manganês,
- ❖ Exsicador,
- ❖ Cadinhos de quartzo,
- ❖ Balões volumétricos de 25 mL em PMP,
- ❖ Balões volumétricos de 10 mL em vidro,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.



Figura 2.5. Espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, Spectr AA 55B).

Reagentes:

- ❖ Água ultrapura (Milli-Q),
- ❖ Ácido nítrico concentrado a 65% (m/m) (Merck, Alemanha),
- ❖ Solução de ácido nítrico a 15% (v/v),
- ❖ Solução de ácido nítrico a 10% (v/v),
- ❖ Solução de ácido nítrico a 5% (v/v),
- ❖ Solução padrão de potássio (1000 mg/L) (Nitrato de potássio, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de sódio (1000 mg/L) (Nitrato de sódio, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de magnésio (1000 mg/L) (Nitrato de magnésio II, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de zinco (1000 mg/L) (Nitrato de zinco II, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de ferro (1000 mg/L) (Nitrato de ferro II, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de cobre (1000 mg/L) (Nitrato de cobre II, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de manganês (1000 mg/L) (Nitrato de manganês II, em ácido nítrico 0,5 M; Merck, Alemanha).

Preparação das soluções padrão:

Preparou-se 100 mL de uma solução padrão de concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ a partir da solução padrão a 1000 mg/L, respectiva para cada elemento em estudo, utilizando ácido nítrico a 5% como solvente. A partir da solução a 10 $\mu\text{g/mL}$, foram preparadas as soluções padrão utilizadas para traçar as retas de calibração dos elementos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Padrões utilizados para a curva de calibração do potássio (K), sódio (Na), magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu) e manganês (Mn).

Elementos	Padrões (µg/mL)				
K	0,20	0,40	0,80	1,00	1,20
Na	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00
Mg	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40
Zn	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00
Fe	0,50	1,00	2,00	2,50	5,00
Cu	0,30	0,50	0,80	1,00	1,50
Mn	0,10	0,30	0,50	1,00	1,50

Processo Analítico

Incineração da amostra

Para os vários elementos essenciais estudados pesaram-se cerca de $2,0 \pm 0,001$ g de amostra liofilizada para cadinhos de quartzo. Colocaram-se os cadinhos contendo a amostra a secar na estufa a 100°C durante uma noite. Em seguida, colocaram-se na mufla a incinerar, aumentando-se lentamente a temperatura até $500 \pm 25^\circ\text{C}$ e deixou-se durante 16h para calcinar. Posteriormente, retiraram-se as amostras da mufla e deixaram-se arrefecer em exsiccador. Para obtenção de cinza branca, humedeceram-se as cinzas com ácido nítrico a 65% que foi evaporando cuidadosamente até à secura sobre uma placa de aquecimento. Os cadinhos foram novamente levados à mufla a 400°C , durante 30 minutos e retiraram-se novamente para um exsiccador.

Doseamento

Aos cadinhos de quartzo foram adicionados 6 mL de ácido nítrico a 15% previamente aquecido, para dissolver as cinzas e, de seguida transferiu-se, filtrando, para balão de 25 mL. Lavaram-se os cadinhos com 6 mL do mesmo ácido e, posteriormente, com água ultrapura (Milli-Q). Ambas as soluções de lavagem foram passadas pelo filtro. Deixou-se arrefecer e perpez-se o volume com água ultrapura, agitando-se de seguida.

A leitura da absorção para cada elemento efetuou-se no respetivo comprimento de onda e registou-se o sinal máximo da absorção obtido pelo aparelho (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Condições de operação para o espectrofotómetro de absorção atómica de chama.

Condições	K	Na	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn
Comprimento de onda (nm)	766,5	589,0	285,2	213,9	248,3	324,8	279,5
Intensidade (m/A)	5	5	4	5	5	4	5
Abertura da fenda (nm)	1,0	0,5	0,5	1,0	0,2	0,5	0,2

Resultados:

O teor de cada elemento foi obtido por comparação com a reta de calibração obtida através da leitura da absorção das soluções padrão. Os resultados foram calculados em mg/kg (ppm) de peso seco que é dado pela expressão abaixo, e posteriormente convertidos em peso húmido com base no valor obtido para a humidade:

$$\text{Concentração do elemento (mg/kg)} = \frac{A \times V}{m} \times \text{fator de diluição}$$

Onde, **A** é a leitura do aparelho na escala em mg/L, **m** é a massa amostra (g) e **V** é o volume de dissolução da amostra (mL).

2.2.4.2. Quantificação de Fósforo (P)

O fósforo foi determinado pelo método espectrofotométrico UV-Vis de acordo com a norma ISO/TC34/SC6, N371 (1996). O método baseia-se na secagem da amostra em estufa e incineração do resíduo a 500 ± 25 °C. Fez-se a hidrólise ácida das cinzas, filtração e diluição seguida de formação de um composto amarelo com uma mistura de monovanadato e heptamolibdato de amónio. Por fim, leu-se no aparelho a $\lambda = 430$ nm, contra ensaio em branco.

Equipamentos e utensílios:

- ❖ Balança analítica de precisão (Mettler Toledo, AG 204),
- ❖ Estufa regulável a 100 ± 5 °C (Memmert, ULE 500),
- ❖ Mufla regulável a 500 ± 25 °C (Heraeus, tipo MR 170 E),
- ❖ Placa de aquecimento (Schott-Gerate, CK 111),
- ❖ Filtros de fibra de vidro (Macherey-Nagel, GF-1 $\phi = 10$ cm),
- ❖ Espectrofotómetro (UNICAM UV/Vis, Helios),
- ❖ Cadinhos de porcelana,
- ❖ Células de quartzo,
- ❖ Exsiccador,
- ❖ Balões volumétricos de 100 mL,
- ❖ Tubos de ensaio,
- ❖ Material de uso corrente de laboratório.

Reagentes:

- ❖ Água ultrapura (Milli-Q),
- ❖ Solução de ácido nítrico 65% - 1:2 (v/v),
- ❖ Solução de monovanadato de amónia 2,5 g/dm³ (Riedel-de Haën, Alemanha),
- ❖ Solução de heptamolibdato de amónia 50 g/dm³ (Merck, Alemanha),
- ❖ Solução padrão de fosfato (0,5 mg P₂O₅/cm³),
- ❖ Reagente colorimétrico (1:1:1).

Preparação da solução de ácido nítrico 1:2 (v/v):

Misturou-se um volume de ácido nítrico (HNO₃; 65%; $\rho = 1,40$ g/mL) com dois volumes de água ultrapura.

Preparação da solução de monovanadato de amónia 2,5 g/dm³:

Dissolveu-se 2,5 g de monovanadato de amónia (NH₄VO₃) em 300 mL de água fervente. Após arrefecimento, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionou-se 20 mL da solução de ácido nítrico 1:2 (v/v), perpez-se o volume com água ultrapura.

Preparação da solução de heptamolibdato de amónia 50 g/dm³:

Dissolveu-se 50 g de heptamolibdato de amónia tetrahidratado [(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O] em cerca de 400 mL de água a 50 °C. Após arrefecimento, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, perfez-se o volume com água ultrapura.

Preparação do reagente colorimétrico (1:1:1):

Misturou-se um volume da solução de ácido nítrico 1:2 (v/v), com um volume da solução de monovadato de amónia 2,5 g/dm³. De seguida, adicionou-se um volume da solução de heptamolibdato de amónia 50 g/dm³ e agitou-se.

Preparação da solução-padrão:

Dissolveram-se em água ultrapura 958,8 mg de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), previamente seco durante 3h a 100±5 °C e arrefecido em exsiccador. De seguida transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, e perfez-se o volume com água ultrapura.

Processo analítico:***Incineração da amostra***

Pesaram-se 2 g de amostra liofilizada para cadinhos de porcelana. Colocaram-se os cadinhos a secar na estufa a 100 °C durante uma noite e, de seguida, colocaram-se na mufla, aumentando lentamente a temperatura até 500±25 °C e deixou-se durante 16h para calcinar. Posteriormente, retiraram-se os cadinhos da mufla e deixou-se arrefecer em exsiccador.

Doseamento

Após arrefecimento, foram adicionados 10 mL de solução de ácido nítrico 1:2 (v/v) nos cadinhos de forma a dissolver a cinza. Após fervura durante 7 minutos, evaporação total do ácido e arrefecimento, a solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo-se o volume com água ultrapura (Millipore) e filtrando-se novamente a amostra. A partir da amostra obtida, pipetou-se para um tubo de ensaio 0,5 mL, e adicionou-se 0,5 mL de solução monovanadato, 0,5 mL de solução de heptamolibdato, 0,5 mL de reagente colorimétrico, e 3,0 mL de água ultrapura (Millipore), perfazendo-se o volume total de 5 mL. Deixou-se repousar durante 15 minutos à temperatura ambiente, efetuando-se de seguida a leitura das absorvâncias a 430 nm.

Resultados:

A partir da curva de calibração obtida, calculou-se a concentração de pentóxido de fósforo (P₂O₅) da amostra em estudo. O teor de fósforo expresso em mg P₂O₅/kg (ppm) de peso seco é dado pela expressão abaixo, e foi posteriormente convertido em peso húmido de acordo com o respetivo teor de humidade:

$$\text{Teor de Fósforo (mg/kg)} = \frac{C \times 1000}{m}$$

Onde, **C** é a concentração de pentóxido de fósforo (em mg/mL), obtida pela curva de calibração e **m** é a massa da amostra (g).

2.3. Análise estatística

Para realizar a análise estatística, verificou-se primeiramente os pressupostos da normalidade da distribuição e homogeneidade de variâncias através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respetivamente. Sempre que necessário, os dados foram transformados em logaritmo de modo a cumprirem as hipóteses dos testes da análise de variância (ANOVA). De seguida, efetuou-se um ANOVA factorial para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos no teor dos diversos parâmetros analisados, usando-se a temperatura (19 °C ou 23 °C) e pH (8,0 unidades ou 7,7 unidades) como variáveis. Posteriormente, testes post-hoc Tukey HSD foram realizados para identificar tais diferenças. Além disso, ANOVA de um fator (“One-way ANOVA”) foi realizada para identificar diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de amostragem (T_0 e T_{61}). A análise estatística foi realizada para um nível de significância de 0,05, utilizando o *software* STATISTICA™ (versão 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

Resultados

3.1. Dados biométricos e condição fisiológica

Após 61 dias de exposição dos linguados aos diferentes cenários de alterações climáticas, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 100% em todos os tratamentos. Nos dois tempos de amostragem (T_0 e T_{61}) foram determinados vários parâmetros que permitiram avaliar a condição fisiológica dos linguados (Tabela 3.1). Relativamente ao peso, verificou-se um aumento significativo nos tratamentos onde se simulou o aumento de temperatura isoladamente e em combinação com a diminuição de pH (i.e. $96,8 \pm 6,3$ g, $p < 0,001$ no tratamento aquecimento e $109,9 \pm 11,2$ g, $p < 0,01$ no tratamento acidificação+aquecimento). Em relação ao comprimento, apesar de se notar um ligeiro aumento nos tratamentos em que a acidificação atua isoladamente e em combinação com o aquecimento, não se observaram diferenças significativas entre os quatro tratamentos ($p > 0,05$). Em ambos os parâmetros, observaram-se aumentos significativos em todos os tratamentos relativamente ao tempo inicial ($p < 0,001$).

No tratamento sujeito a aquecimento verificou-se um aumento significativo nos índices de condição de Fulton ($2,0 \pm 0,2$, $p < 0,05$) e hepatossomático ($2,7 \pm 0,1$ %, $p < 0,001$), no entanto, observou-se uma diminuição significativa no índice visceral ($1,6 \pm 0,1$ %, $p < 0,001$). Além disso, HSI foi significativamente afetado pelo tratamento de acidificação atuando combinado com o aquecimento ($p < 0,0001$), no qual se observou valores significativamente inferiores (i.e. acidificação+aquecimento= $0,9 \pm 0,1$, $p < 0,001$). Por comparação entre os tempos experimentais, verificaram-se alterações significativas em todos os índices, ocorrendo um aumento significativo após 61 dias de exposição em alguns dos diferentes cenários ($p < 0,001$; algumas exceções no HSI e VSI).

No cálculo da taxa de crescimento relativa (TCR), observaram-se valores significativamente mais elevados nos linguados sujeitos a acidificação+aquecimento ($257,4 \pm 15,3$ %; $p < 0,001$), no entanto não se observaram variações significativas em nenhum dos tratamentos na taxa de crescimento específico em termos de proteína (TCEp).

Tabela 3.1. Peso (g), comprimento total (cm), índices hepatossomático (HSI, %), visceral (VSI, %) e de Fulton (F), taxa de crescimento relativa (TCR; %) e taxa de crescimento específico em termos de proteína (TCEp; %/dia) dos linguados juvenis no início e final da experiência (T₀ e T₆₁ respectivamente) para cada um dos tratamentos.

	T ₀	T ₆₁			
	Controlo	Controlo	Acidificação	Aquecimento	Acidificação + Aquecimento
Peso (g)	25,4±5,8	61,9±2,4 ^{c,*}	85,3±6,9 ^{bc,*}	96,8±6,3 ^{ab,*}	109,9±11,2 ^{a,*}
Comprimento Total (cm)	12,8±0,2	17,3±0,5 [*]	19,8±1,2 [*]	18,0±0,6 [*]	19,3±1,0 [*]
K	1,2±0,2	1,5±0,2 ^{b,*}	1,4±0,1 ^{b,*}	2,0±0,2 ^{a,*}	1,4±0,1 ^{b,*}
HSI (%)	1,0±0,2	1,4±0,1 ^{b,*}	1,0±0,2 ^{bc}	2,7±0,1 ^{a,*}	0,9±0,1 ^c
VSI (%)	3,4±0,2	3,4±0,1 ^a	3,9±0,2 ^{a,*}	1,6±0,1 ^{b,*}	3,5±0,3 ^a
TCR (%)	-	123,7±25,3 ^c	191,9±5,6 ^b	176,8±16,2 ^b	257,4±15,3 ^a
TCEp (%/dia)	-	0,10±0,03	0,02±0,003	0,07±0,02	0,10±0,05

Valores (média±desvio padrão) em peso húmido. Letras diferentes (a-c) na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0,05$; $n=3$). O asterisco (*) indica diferenças significativas entre os valores obtidos no tratamento inicial (T₀) e cada um dos tratamentos no tempo final (T₆₁). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (*i.e.* T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

3.2. Composição Química Aproximada

A composição química aproximada (humidade, cinza, proteína, gordura e glicogénio) assim como o valor da energia do músculo dos linguados expostos aos diferentes tratamentos encontram-se representados na Tabela 3.2. O teor de humidade foi significativamente afetado pelo tratamento do aquecimento atuando isoladamente, no qual se observou um aumento significativo (78,4±0,3 %, $p < 0,05$). Comparativamente ao tempo inicial, verificou-se um decréscimo significativo no teor de humidade apenas no controlo ($p < 0,01$), enquanto que o teor de cinza aumentou apenas no tratamento de aquecimento ($p < 0,05$). Não foram verificadas alterações significativas nos teores de proteína e no valor de energia entre os quatro tratamentos assim como entre os tempos de amostragem ($p > 0,05$). Relativamente ao teor de gordura, destacou-se a diminuição significativa no tratamento acidificação+aquecimento (1,7±0,0 %, $p < 0,05$), não havendo diferenças significativas entre os tempos de amostragem. No teor de glicogénio foi notório o aumento significativo entre o T₀ e o T₆₁ em todos os tratamentos ($p < 0,05$), no entanto, não se observaram diferenças significativas entre os quatro cenários de exposição ($p > 0,05$).

Tabela 3.2. Composição química aproximada (%) e energia (kJ/g) dos linguados juvenis no início e final da experiência (T₀ e T₆₁ respetivamente) para cada um dos tratamentos.

	T ₀	T ₆₁			
	Controlo	Controlo	Acidificação	Aquecimento	Acidificação + Aquecimento
Humidade (%)	78,4±0,1	77,1±0,2 ^{b,*}	77,6±0,3 ^{ab}	78,4±0,3 ^a	77,5±0,1 ^{ab}
Cinza (%)	1,5±0,0	1,6±0,1 ^{ab}	1,4±0,0 ^b	1,7±0,2 ^{a,*}	1,5±0,0 ^b
Proteína (%)	14,0±0,1	14,3±0,1	14,3±1,1	14,3±0,2	14,5±0,2
Gordura (%)	2,2±0,5	2,4±0,1 ^a	2,3±0,0 ^{ab}	1,8±0,2 ^{ab}	1,7±0,0 ^b
Glicogénio (%)	0,03±0,01	0,10±0,04 [*]	0,13±0,03 [*]	0,17±0,00 [*]	0,09±0,01 [*]
E (kJ/g)	4,26±0,24	4,27±0,20	4,38±0,29	4,17±0,02	4,15±0,03

Valores (média±desvio padrão) em peso húmido. Letras diferentes (a-b) na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0.05$; $n=3$). O asterisco (*) indica diferenças entre os valores obtidos no tempo inicial (T₀) e cada um dos tratamentos no tempo final (T₆₁). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

3.3. Perfil de Ácidos Gordos

O tratamento controlo no tempo final não está representado devido a limitações experimentais que não permitiram a realização da análise dos ácidos gordos. No entanto, uma vez que o perfil de ácidos gordos obtido no início do ensaio corresponde ao perfil descrito para esta espécie por outros autores (Fernandes et al., 2012) e como se trata de controlo, as condições do controlo inicial foram iguais às do controlo no T₆₁, considerou-se que o perfil no controlo final seria semelhante ao obtido no controlo inicial.

Na Figura 3.1 encontra-se representado o somatório dos ácidos gordos saturados (Σ SFA), assim como os SFA predominantes nas amostras obtidas neste estudo.

Os SFA encontrados mais relevantes são o ácido mirístico (MA; C14:0), o ácido palmítico (PA; C16:0) e o ácido esteárico (SA; C18:0) em todos os tratamentos, verificando-se uma predominância do C16:0. O aquecimento e acidificação atuando isoladamente promoveram um aumento significativo dos teores de SFA relativamente às condições controlo ($p < 0,01$), com exceção do C14:0 cujos teores nos tratamentos de controlo apenas foram significativamente diferentes do tratamento acidificação ($p < 0,05$). O mesmo não se observou quando estes dois parâmetros abióticos atuaram em simultâneo (i.e. acidificação+aquecimento), não ocorrendo diferenças significativas em relação ao controlo ($p > 0,05$), mas apresentando teores significativamente mais baixos do que a acidificação (C16:0, C18:0 e Σ SFA, $p < 0,05$) e aquecimento (C18:0, $p < 0,05$) atuando isoladamente.

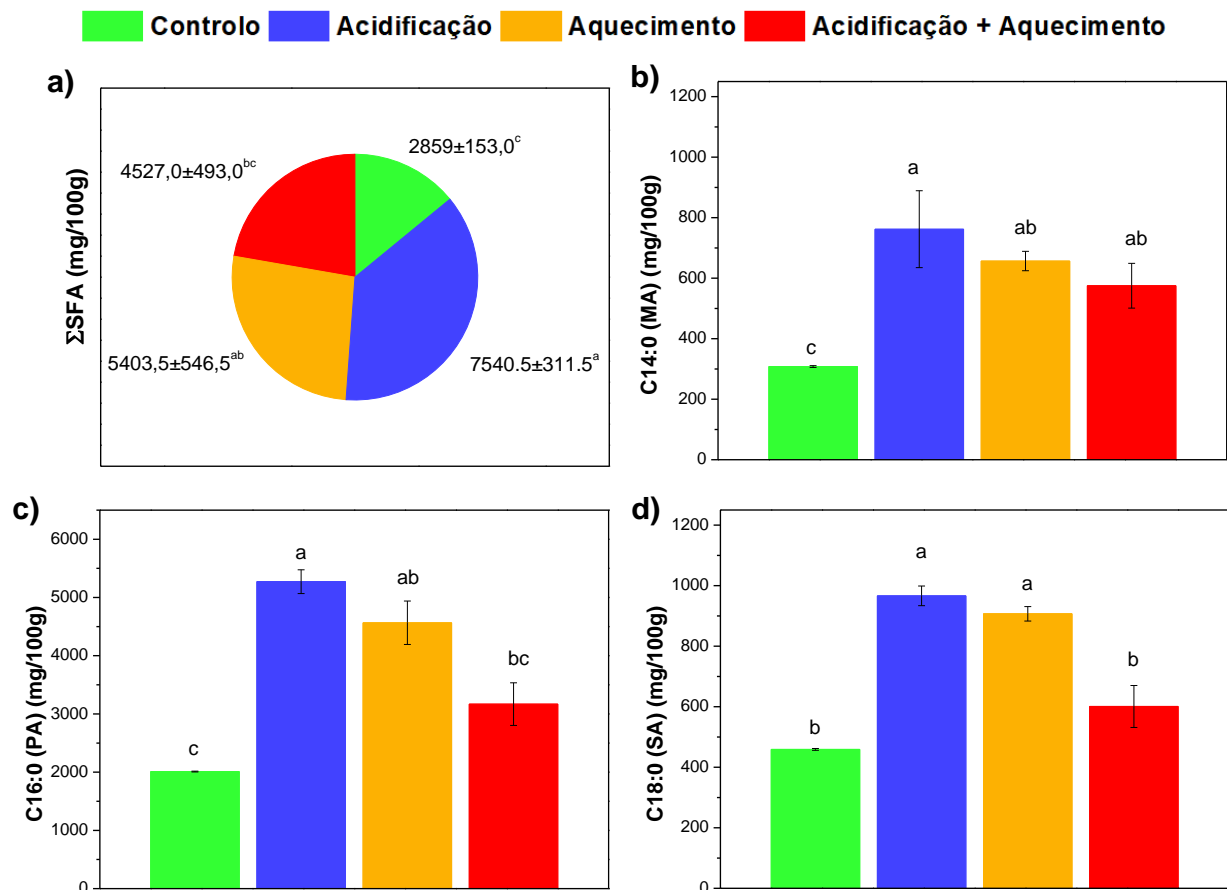


Figura 3.1. Teor dos principais ácidos gordos saturados (SFA; mg/100 g de peso seco) no músculo dos linguados após 61 dias de exposição a cada um dos tratamentos (média±desvio padrão; n=3): a) total SFA (Σ SFA); b) ácido mirístico (MA; C14:0); c) ácido palmítico (PA; C16:0); e d) ácido esteárico (SA; C18:0). Letras diferentes (a-c) indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0,05$). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

Na Figura 3.2 está representado o somatório dos ácidos gordos monoinsaturados (Σ MUFA), bem como os principais compostos pertencentes a este grupo. No grupo dos MUFA, os principais ácidos gordos detetados no músculo do linguado foram os seguintes: C18:1 n-9 > C16:1 n-7 > C20:1 n-9 > C22:1 n-9. Por oposição ao padrão encontrado nos SFA, o aquecimento e acidificação atuando isoladamente resultaram numa diminuição significativa do teor total de MUFA (exceto na acidificação), C16:1 n-7 e C22:1 n-9, relativamente às condições controlo, mas também em relação ao cenário que simulava a interação entre os dois fatores de *stress* (i.e. acidificação+aquecimento), exceto no teor do C20:1 n-9 no tratamento da acidificação ($p < 0,01$).

É de salientar ainda que a interação entre os dois fatores de *stress* (i.e., tratamento acidificação+aquecimento) apenas foi significativamente inferior ao controlo no que respeita ao teor de C22:1 n-9 ($p < 0,01$).

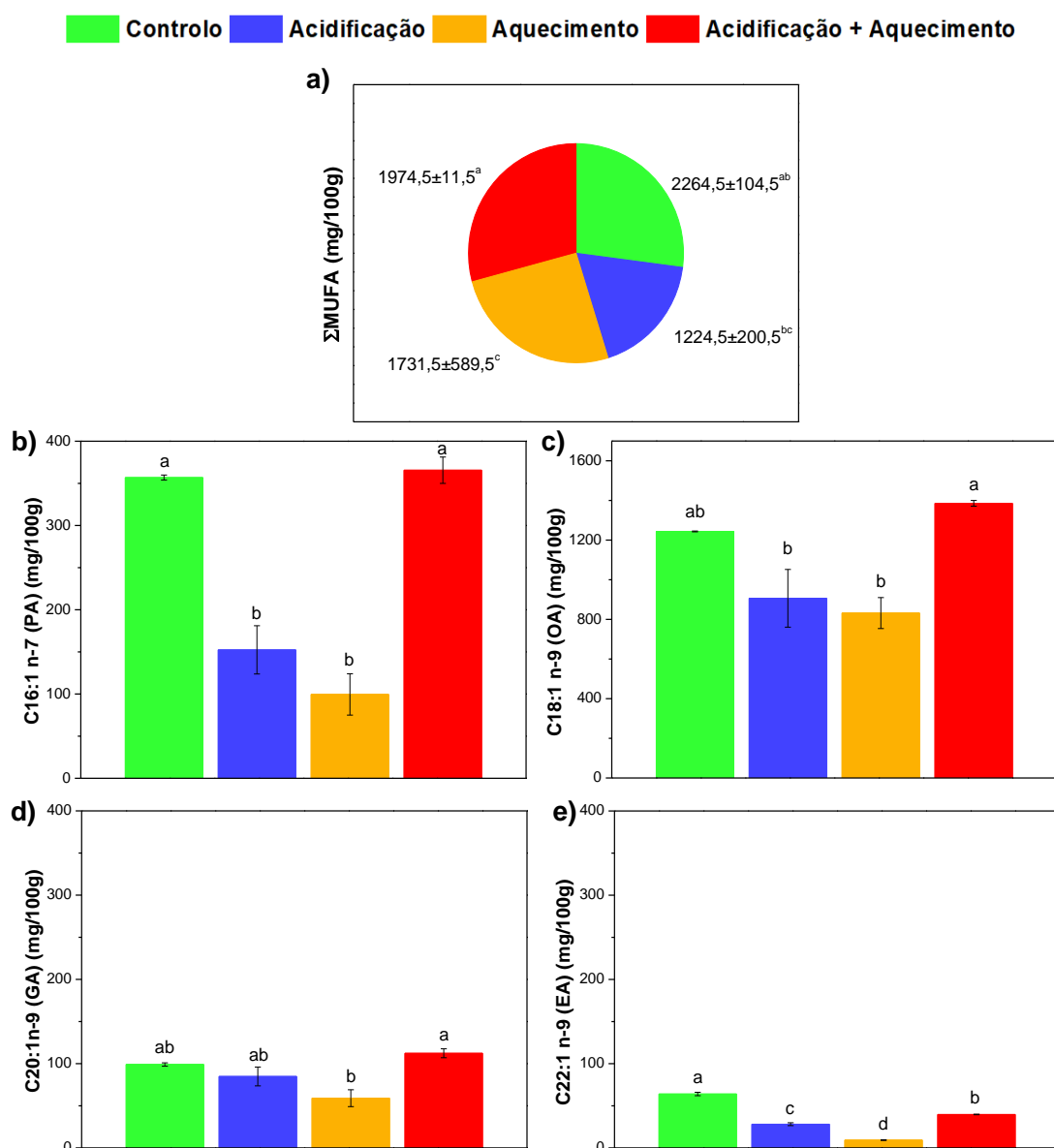


Figura 3.2. Teor dos principais ácidos gordos monoinsaturados (MUFA; mg/100g de peso seco) no músculo dos linguados após 61 dias de exposição a cada um dos tratamentos (média±desvio padrão; n=3). a) total MUFA (ΣMUFA); b) ácido palmítico (PA; C16:1 n-7); c) ácido oleico (OA; C18:1 n-9); d) ácido gadoleico (GA; C20:1 n-9); e) ácido erúico (EA; C22:1 n-9). Letras diferentes (a-d) indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0,05$). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

Na Figura 3.3 está representado o somatório dos ácidos gordos polinsaturados (ΣPUFA), assim como os PUFA presentes em maior concentração no músculo do linguado. Dentro deste grupo, os principais PUFA que foram detetados foram o ácido linoleico (LA; C18:2n-6), seguido do ácido docosapentaenóico (DHA; C22:6n-3), ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5n-3) e ácido α-linolénico (ALA; C18:3n-3). Em geral, os efeitos das alterações climáticas promoveram uma diminuição significativa dos teores de PUFA relativamente ao controlo, em particular no tratamento simulando o aquecimento e acidificação isoladamente (exceto no ΣPUFA no tratamento acidificação). Além disso, o tratamento acidificação+aquecimento induziu uma redução significativa em relação ao controlo apenas no EPA e DHA ($p < 0,05$). Entre os três tratamentos que simu-

lavam as alterações climáticas, verificou-se mais uma vez que o tratamento simulando acidificação e aquecimento em simultâneo resultou em teores mais elevados de PUFA que o aquecimento (LA, ALA, EPA e DHA) e acidificação (LA, EPA e DHA) atuando isoladamente.

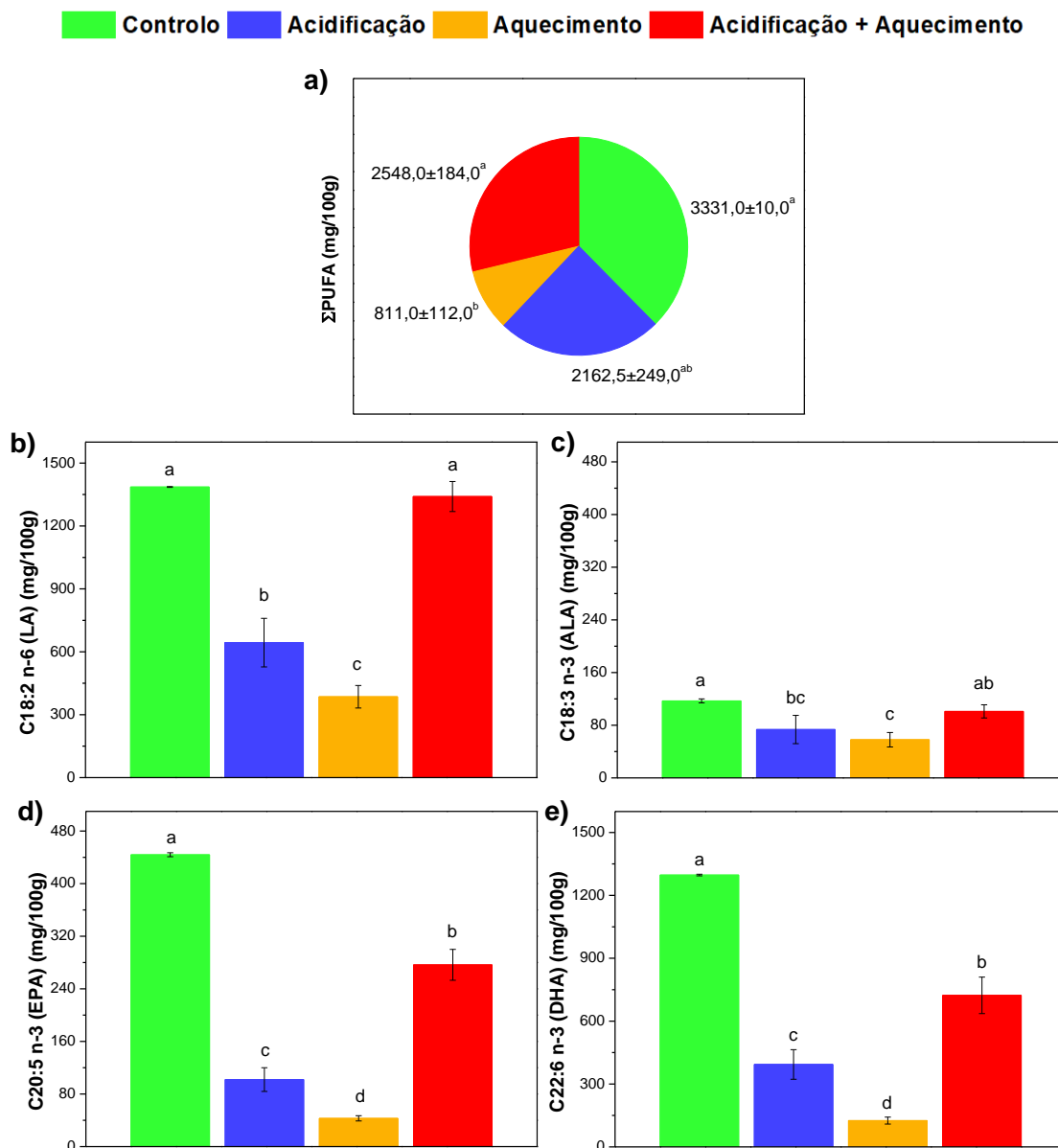


Figura 3.3. Teor dos principais ácidos gordos polinsaturados (PUFA; mg/100g de peso seco) no músculo dos linguados após 61 dias de exposição a cada um dos tratamentos (média±desvio padrão; n=3). a) total PUFA (ΣPUFA); b) ácido linoleico (LA; C18:2 n-6); c) ácido α-linolénico (ALA; C18:3 n-3); d) ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5 n-3); e) ácido docosapentaenóico (EA; C22:6 n-3). Letras diferentes (a-d) indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0,05$). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

Na Figura 3.4, estão representados os somatórios dos ácidos gordos ômega-3 e ômega-6 ($\Sigma\omega3$ e $\Sigma\omega6$, respetivamente). Verificou-se que 61 dias de exposição às alterações climáticas, traduziram-se numa diminuição significativa de $\omega3$ e no aumento significativo de $\omega6$ nos três tratamentos em que os linguados foram expostos a acidificação e aquecimento, atuando sozinhos ou combinados relativamente ao controlo ($p<0,05$; com exceção do tratamento aquecimento+acidificação no $\Sigma\omega6$). Além disso, esta diminuição foi mais evidente quando estes parâmetros abióticos atuaram isoladamente. Porém, apenas não ocorreram diferenças significativas entre o controlo e o tratamento que simulava a acidificação em combinação com o aquecimento no teor de $\omega6$.

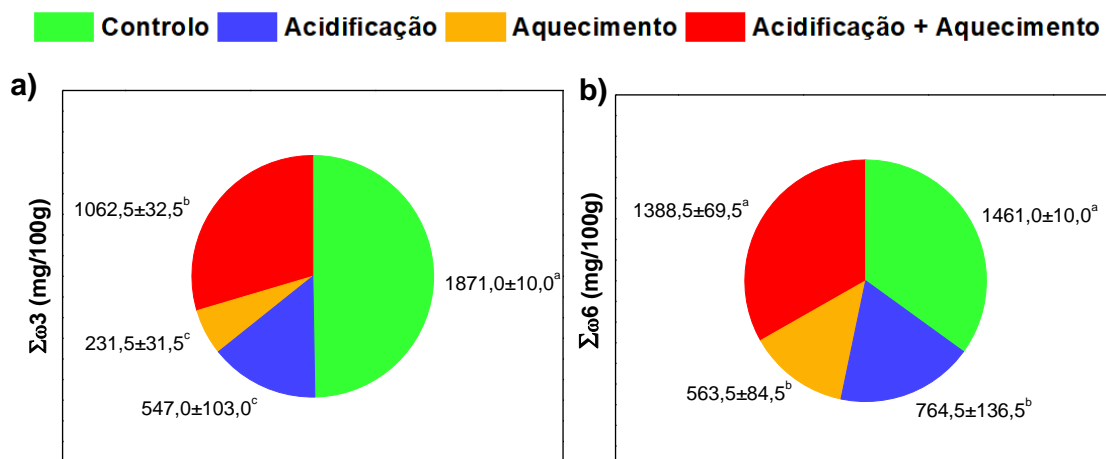


Figura 3.4. Somatório dos ácidos gordos ômega 3 e ômega 6 no músculo dos linguados após 61 dias de exposição a cada um dos tratamentos (Controlo, Acidificação, Aquecimento, Acidificação+Aquecimento; média±desvio padrão; mg/100 g em peso seco). a) $\Sigma\omega3$ -somatório dos ácidos gordos ômega 3; b) $\Sigma\omega6$ -somatório dos ácidos gordos ômega 6. Letras diferentes (a-c) indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p<0,05$; $n=3$). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. $T=19\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=8,0$); Acidificação – temperatura estabelecida a $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH a 7,7 unidades.

Para o estudo da qualidade nutricional do linguado foram ainda determinados alguns parâmetros nutricionais, nomeadamente os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), bem como a razão hipocolesterolémico/hipercolesterolémico (h/H), e foram ainda calculados outros parâmetros, como o total dos ácidos gordos EPA e DHA (EPA+DHA) assim como a razão entre os somatórios dos ácidos gordos polinsaturados ômega-3 e ômega-6 ($\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$; Tabela 3.3). Verificou-se que os índices nutricionais determinados também refletiram, em parte, as tendências descritas anteriormente, tendo o IA e o IT sido mais elevados nos tratamentos simulando o aquecimento isoladamente em comparação com o controlo ($p<0,05$, respetivamente). No entanto, observou-se uma redução significativa em todos os três tratamentos de exposição às alterações climáticas nos valores de h/H, EPA+DHA (particularmente se a acidificação ou aquecimento atuam sozinhos; $p<0,001$) e $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ (particularmente se a acidificação atua isoladamente; $p<0,05$).

Tabela 3.3. Valores dos teores de EPA+DHA, do $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ e dos índices nutricionais obtidos no músculo do linguado após 61 de exposição a cada um dos tratamentos: IA (índice de aterogenicidade), IT (índice de trombogenicidade), h/H (hipocolesterolêmico/hipercolesterolêmico).

	T₆₁			
	Controlo	Acidificação	Aquecimento	Acidificação + Aquecimento
IA	0,6±0,1 ^b	2,6±0,5 ^{ab}	3,2±1,5 ^a	2,2±1,4 ^{ab}
IT	0,4±0,0 ^b	2,0±0,4 ^{ab}	3,1±1,7 ^a	0,5±0,4 ^b
h/H	1,9±0,5 ^a	0,5±0,1 ^b	0,5±0,4 ^b	0,8±0,4 ^b
EPA+DHA (mg/100g)	1741,0±566,0 ^a	495,3±88,7 ^c	168,5±20,5 ^c	999,5±110,5 ^b
$\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$	1,1±0,2 ^a	0,7±0,0 ^b	0,4±0,0 ^c	0,8±0,0 ^b

Valores (média±desvio-padrão) obtidos em peso seco. Letras diferentes (a-c) na mesma linha indicam diferenças significativas entre os quatro tratamentos (teste ANOVA. $p<0,05$; $n=3$). Abreviaturas: Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

3.4. Minerais

Para avaliar a composição mineral do músculo do linguado em estudo foram analisados vários macrominerais, o potássio (K), magnésio (Mg), sódio (Na) e fósforo (P), e também diversos microminerais, o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), encontrando-se as concentrações obtidas para cada um dos tratamentos na Tabela 3.4.

Entre os macrominerais, o K foi o mineral mais abundante encontrado em todos os tratamentos, seguido do P, Na e Mg. Quando comparados os três tratamentos sujeitos a fatores de *stress*, observou-se que apenas a concentração de Na aumentou significativamente com o aquecimento (574,8±24,6 mg/kg; $p<0,05$) e diminuiu com a Acidificação (389,2±5,8 mg/kg; $p<0,05$), ambos atuando isoladamente, embora não tenham sido significativamente diferentes do tratamento Controlo. Nos restantes macrominerais, não se observaram diferenças significativas entre os quatro tratamentos ($p>0,05$). Em relação aos microminerais estudados, o Fe e o Zn foram os que apresentaram valores de concentração mais elevados. Além disso, apenas se verificaram diferenças significativas entre os diferentes cenários de alterações climáticas para o Zn, sendo que o aquecimento atuando isoladamente levou a um aumento significativo da concentração deste micromineral (4,5±0,0; $p<0,01$) relativamente ao Controlo (4,0±0,1 mg/kg, $p<0,05$). Por comparação entre os tempos inicial (T₀) e final (T₆₁), foram detetadas diferenças significativas em todos os tratamentos apenas nas concentrações de K, Na e Fe, ocorrendo um aumento para o K ($p<0,01$) e uma diminuição para o Na e Fe ($p<0,05$ e $p<0,01$, respetivamente).

Tabela 3.4. Teor de elementos essenciais (mg/kg) no músculo do linguado juvenil *Solea senegalensis* no início e final da experiência (T₀ e T₆₁ respectivamente) para cada um dos tratamentos.

		T ₀	T ₆₁			
		Controlo	Controlo	Acidificação	Aquecimento	Acidificação + Aquecimento
Macro (mg/kg)	K	3103,4±59,9	3724,9±63,9*	3928,4±25,7*	3770,7±163,6*	3887,6±70,4*
	Mg	260,3±4,9	255,8±3,4	245,6±4,9	283,7±13,2	245,5±3,3
	Na	757,8±89,5	485,4±46,1 ^{ab,*}	389,2±5,8 ^{b,*}	574,8±24,6 ^{a,*}	445,0±25,5 ^{ab,*}
	P	NA	2684,6±17,9	2522,3±27,7	2607,4±94,9	2659,3±60,1
Micro (mg/kg)	Cu	0,2±0,0	0,2±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0
	Fe	4,8±0,4	1,9±0,1*	1,7±0,0*	1,7±0,2*	1,5±0,0*
	Mn	0,5±0,0	0,4±0,1	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0
	Zn	4,3±0,2	4,0±0,1 ^b	3,8±0,0 ^b	4,5±0,0 ^a	4,1±0,1 ^b

Valores (média±desvio padrão) obtidos em peso húmido. Letras diferentes (a-c) na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste ANOVA. $p < 0,05$; $n=3$). O asterisco (*) indica diferenças entre os valores obtidos no tempo inicial (T₀) e o tempo final (T₆₁). Abreviaturas: NA: Não analisado; K: Potássio; Mg: Magnésio; Na: Sódio; P: Fósforo; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês; Zn: Zinco. Controlo – temperatura e pH de referência (i.e. T=19 °C e pH=8,0); Acidificação – temperatura estabelecida a 19 °C e pH a 7,7 unidades; Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 8,0 unidades; Acidificação + Aquecimento - temperatura estabelecida a 23 °C e pH a 7,7 unidades.

3.5. Influência do aquecimento e acidificação no valor nutricional do linguado

Com vista a estudar a influência dos diferentes cenários de alterações climáticas na qualidade nutricional do linguado, foi calculada a contribuição nutricional que a parte edível proporciona em termos de ácidos gordos e minerais (macro e microelementos). No caso dos minerais, foram inicialmente calculadas as doses diárias estimadas (DDE) para cada elemento recorrendo ao valor médio (mg/kg) de cada mineral, e considerando uma refeição de 150 g de linguado (músculo). Posteriormente, a contribuição nutricional do linguado foi estimado para adultos (>18 anos) e crianças (0 a 10 anos) com base no cálculo da percentagem da dose diária recomendada (DDR) obtida, tendo em conta os níveis recomendados (mg/dia) para cada um dos nutrientes (ácidos gordos e minerais; EFSA, 2010, 2017; Tabelas 3.5 a 3.7).

Com base nos teores de EPA+DHA, $\Sigma\omega 3$ e $\Sigma\omega 6$ obtidos nas amostras iniciais, verificou-se que o consumo de 150 g de linguado produzido nas condições de temperatura e pH normalmente utilizadas atualmente (i.e. tratamento controlo), fornece mais de 100% da DDR de ácidos gordos $\omega 3$ assim como de EPA+DHA para as crianças, enquanto para os adultos fornece mais de 100% da DDR somente para EPA+DHA, contribuindo apenas com 54,6% de $\Sigma\omega 3$ e 5,3% de $\Sigma\omega 6$ (Tabela 3.4). Contudo, verificou-se que a exposição dos linguados aos diferentes cenários de alterações climáticas promoveu a ocorrência de alterações do seu valor nutricional para adultos, particularmente nos tratamentos em que os fatores abióticos atuaram isoladamente (i.e. aquecimento e Acidificação), conduzindo a uma redução da percentagem de DDR tanto de EPA+DHA (21,9% e 87,5%, respetivamente), como de $\Sigma\omega 3$ (6,8% e 21,9%, respetivamente) e $\Sigma\omega 6$ (2,1% e 4,0%, respetivamente). No caso das crianças, a diminuição foi mais acentuada nestes ácidos gordos quando o aquecimento atuou sozinho (EPA+DHA: 54,7%; $\Sigma\omega 3$: 22,7%; $\Sigma\omega 6$: 6,9%). No entanto, quando o aquecimento e acidificação atuaram combinados, somente

conduziu à diminuição de DDR de $\Sigma\omega 3$ para adultos (33,9%) comparativamente ao tratamento Controlo (54,6%).

Relativamente aos macroelementos, verifica-se que o linguado juvenil produzido nas condições atuais (tratamento Controlo) constitui uma boa fonte de K e Mg, contribuindo, respetivamente, com cerca de 13,3% e 8,9% da DDR para os adultos e, em ambos os casos, com cerca de 26% da DDR para crianças (Tabelas 3.6 e 3.7). Observou-se para o Na, que o aquecimento contribuiu para o aumento enquanto a acidificação contribuiu para o decréscimo da percentagem de DDR nos adultos.

Por comparação entre os tempos experimentais (T_0 e T_{61} , respetivamente), verificou-se que o linguado passou a fornecer uma maior percentagem da DDR de K, tanto para adultos como para crianças, no tempo final em todos os tratamentos. No caso do Na verificou-se uma diminuição da %DDR nos três cenários de exposição às alterações climáticas.

No que diz respeito aos microelementos, o linguado juvenil produzido nas condições de temperatura e pH atuais (tratamento Controlo) proporciona uma percentagem de DDR mais elevada de Zn para ambos os grupos etários (5,9% para adultos e 12,9% para crianças), assim como de Fe para adultos (6,5%) e Cu para crianças (8,3%; Tabelas 3.6 e 3.7). No Zn observou-se que o aquecimento contribuiu para um aumento (6,1% nos adultos e 13,5% nas crianças), da DDR.

Quando comparados com os tempos inicial e final, verificou-se uma diminuição acentuada da DDR fornecida pelo Fe nos quatro tratamentos de exposição aos fatores de stress ($T_{61}=2,0-2,6\%$ em ambos os grupos etários) em relação ao Controlo inicial (Fe: 6,5% em ambos os grupos etários).

Tabela 3.5. Contribuição nutricional do linguado juvenil em termos de ácidos gordos para adultos (>18 anos) e crianças (0-10 anos), através do consumo de uma refeição de 150 g de músculo de peixe.

			T ₆₁							
			Controlo		Acidificação		Aquecimento		Acidificação + Aquecimento	
Ácidos Gordos		DDR (mg/dia)	Teor (mg/150g)	DDR(%)	Teor (mg/150g)	DDR(%)	Teor (mg/150g)	DDR(%)	Teor (mg/150g)	DDR(%)
EPA+DHA	Adultos	250	562,9	>100	218,7	87,5	54,7	21,9	337,1	>100
	Crianças	100		>100		>100		54,7		>100
Σω3	Adultos	1109	605,0	54,6	243,1	21,9	75,1	6,8	375,6	33,9
	Crianças	331		>100		73,5		22,7		>100
Σω6	Adultos	8869	472,4	5,3	352,2	4,0	182,9	2,1	468,3	5,3
	Crianças	2650		17,8		13,3		6,9		17,7

* DDR (mg/dia): Dose diária recomendada de acordo com a EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010 e 2017). Abreviaturas: EPA- Ácido Eicosa-pentaenóico; DHA- Ácido Docosapentaenóico; Σω3-somatório dos ácidos gordos ómega 3; Σω6-somatório dos ácidos gordos ómega 6.

Tabela 3.6. Contribuição nutricional do linguado juvenil em termos de macro e microelementos essenciais para adultos (>18anos), através do consumo de uma refeição de 150 g de músculo de peixe.

		T₀			T₆₁											
	DDR (mg/dia)	Controlo			Controlo			Acidificação			Aquecimento			Acidificação + Aquecimento		
	Adultos	Teor (mg/kg)	DDE (mg/150g)	DDR (%)	Teor (mg/kg)	DDE (mg/150g)	DDR (%)	Teor (mg/kg)	DDE (mg/150g)	DDR (%)	Teor (mg/kg)	DDE (mg/150g)	DDR (%)	Teor (mg/kg)	DDE (mg/150g)	DDR (%)
K	3500	3103,4	465,5	13,3	3724,9	558,7	16,0	3928,4	589,3	16,8	3770,7	565,6	16,2	3887,6	583,1	16,7
Mg	232- 439	260,3	39,0	8,9	255,8	38,4	8,7	245,6	36,8	8,4	283,7	42,6	9,7	245,5	36,8	8,4
Na	1200- 1500	757,8	113,7	7,6	757,8	113,7	7,6	389,2	58,4	3,9	574,8	86,2	5,7	445,0	66,8	4,5
P	550	-	-	-	2684,6	402,7	73,2	2522,3	378,3	68,8	2607,4	391,1	71,1	2659,3	398,9	72,5
Cu	0,9	0,2	0,03	3,3	0,2	0,03	3,3	0,2	0,03	3,3	0,1	0,02	1,7	0,2	0,03	3,3
Fe	11	4,8	0,7	6,5	1,9	0,3	2,6	1,7	0,3	2,3	1,7	0,3	2,3	1,5	0,2	2,0
Mn	3	0,5	0,1	2,5	0,4	0,1	2,0	0,3	0,05	1,5	0,3	0,05	1,5	0,3	0,05	1,5
Zn	8-11	4,3	0,6	5,9	4,0	0,6	5,5	3,8	0,6	5,2	4,5	0,7	6,1	4,1	0,6	5,6

* DDE: Dose diária estimada; DDR (mg/dia): Dose diária recomendada de acordo com a EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010 e 2017), (a negrito está representada a dose diária recomendada utilizada para o cálculo de DDR, em %).

Tabela 3.7. Contribuição nutricional do linguado juvenil em termos de macro e microelementos essenciais para crianças (0-10 anos), através do consumo de uma refeição de 150 g de músculo de peixe.

		T₀			T₆₁											
	DDR (mg/dia)	Controlo			Controlo			Acidificação			Aquecimento			Acidificação + Aquecimento		
	Crianças	Teor (mg/kg)	DDE (mg/ 150g)	DDR (%)	Teor (mg/kg)	DDE (mg/ 150g)	DDR (%)	Teor (mg/ kg)	DDE (mg/ 150g)	DDR (%)	Teor (mg/ kg)	DDE (mg/ 150g)	DDR (%)	Teor (mg/ kg)	DDE (mg/ 150g)	DDR (%)
K	750-1800	3103,4	465,5	25,9	3724,9	558,7	31,0	3928,4	589,3	32,7	3770,7	565,6	31,4	3887,6	583,1	32,4
Mg	72-150	260,3	39,0	26,0	255,8	38,4	25,6	245,6	36,8	24,6	283,7	42,6	28,4	245,5	36,8	24,6
P	160-440	-	-	-	2684,6	402,7	91,5	2522,3	378,3	86,0	2607,4	391,1	88,9	2659,3	398,9	90,7
Cu	0,36	0,2	0,03	8,3	0,2	0,03	8,3	0,2	0,03	8,3	0,1	0,02	4,2	0,2	0,03	8,3
Fe	7-11	4,8	0,7	6,5	1,9	0,3	2,6	1,7	0,3	2,3	1,7	0,3	2,3	1,5	0,2	2,0
Mn	0,02-1,5	0,5	0,1	5,0	0,4	0,1	4,0	0,3	0,05	3,0	0,3	0,05	3,0	0,3	0,05	3,0
Zn	3-5	4,3	0,6	12,9	4,0	0,6	12,0	3,8	0,6	11,4	4,5	0,7	13,5	4,1	0,6	12,3

* DDE: Dose diária estimada; DDR (mg/dia): Dose diária recomendada de acordo com a EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010 e 2017), (a negrito está representada a dose diária recomendada utilizada para o cálculo de DDR, em %).

Discussão

Os produtos provenientes da pesca e aquacultura exercem um papel de elevada importância na alimentação humana, sendo atribuído ao consumo de pescado inúmeros benefícios nutricionais. Os resultados apresentados neste estudo revelam os impactos interativos do aquecimento e/ou acidificação da água do mar na qualidade nutricional do linguado-Branco juvenil (*Solea senegalensis*) de aquacultura.

De acordo com os resultados obtidos, o pH da água do mar e, sobretudo, a temperatura elevada têm um papel preponderante no peso dos linguados, tendo-se observado em geral um aumento de peso nos peixes sujeitos aos efeitos das alterações climáticas. Tal poderá estar relacionado com o fato das temperaturas mais elevadas aumentarem não só o consumo de alimento por parte dos peixes, a fim dos organismos suprirem as suas necessidades energéticas em resposta a um metabolismo mais acelerado, mas também devido à atividade das enzimas digestivas, o que favorece assim a digestão e absorção dos nutrientes (Kausar e Salim, 2006; Lah et al., 2018). Estudos feitos em outras espécies de peixes como *Labeo rohita* (20-26 °C; Kausar e Salim, 2006), *Takifugu obscurus* (15-30 °C; Yoo e Lie, 2016), *Seriola dumerili* (17-26 °C; Fernández-Montero et al., 2017) e *Diplodus sargus* (19-24 °C; Anacleto et al., 2018) demonstraram que o aumento de temperatura teve um efeito direto no crescimento. Num outro estudo realizado por Pimentel et al. (2014) também se verificou que o aumento de temperatura (18-22 °C) favorecia o crescimento da mesma espécie de linguado deste estudo (*Solea senegalensis*), no entanto, a acidificação ($\Delta\text{pH}=7,5-8,0$) teve uma influência negativa. Por outro lado, no estudo feito por Coleman et al. (2019) em sargo-dourado (*Acanthopagrus australis*), apesar do aumento de temperatura também favorecer o crescimento, neste caso a acidificação não apresentou variações significativas. Deste modo, de acordo com os padrões obtidos tanto no presente estudo como em trabalho anteriores, a temperatura parece ser o fator mais preponderante (comparativamente ao pH) no que respeita ao efeito das variáveis abióticas nas taxas metabólicas dos organismos aquáticos assim como no seu crescimento (Anacleto et al., 2018; Barbosa et al., 2017; Fernández-Montero et al., 2017; Sun e Chen, 2014).

De um modo geral, o pH oceânico sofre alterações devido a causas naturais, tais como a respiração dos organismos e a fotossíntese de plantas marinhas. Como tal, os peixes tornaram-se resistentes a ligeiras flutuações (Kim et al., 2013), pois conseguem regular o equilíbrio ácido-base através do transporte ativo de iões e da acumulação de bicarbonato (Pörtner et al., 2005;

Rosa et al., 2017). No entanto, as adaptações a estas variações requerem elevados gastos energéticos e elevado consumo de O₂, para manter o equilíbrio homeostático interno. A energia proveniente do alimento não só foi canalizada para o crescimento e peso, mas também para a manutenção do equilíbrio interno, podendo justificar o fato dos linguados em estudo terem sobrevivido em condições de acidificação. Um estudo realizado por Morgan et al. (2001) mostrou que a truta (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a um ambiente mais ácido (pH=5,2) aumentou o consumo de alimento como forma de compensar os gastos energéticos provocados pelas trocas iônicas constantes com o meio, de modo a atingir o equilíbrio homeostático interno. De igual forma, Kim et al. (2013) também demonstrou que a acidificação favoreceu o crescimento de larvas (*Paralichthys olivaceus*). No entanto, existem alguns estudos que revelaram a inalteração de peso e comprimento dos organismos quando expostos a cenários de acidificação (Foss et al., 2003; Hosfeld et al., 2008; Perry et al., 2015). Estudos realizados por Bignami et al. (2014) e Ishimatsu et al. (2008) constataram que as alterações provocadas pela acidificação dos oceanos ainda são um cenário incerto, uma vez que os estudos realizados até ao momento não são consensuais.

O índice de condição de Fulton (K) permite avaliar o bem-estar dos peixes relacionando os fatores ambientais, aspectos comportamentais e gastos energéticos (Araújo et al., 2011; Braga, 1986), sendo calculado através do peso e comprimento, e havendo uma relação diretamente proporcional entre eles. Desta forma, o K aumentou nos tratamentos sujeitos ao aquecimento, uma vez que foi onde se observou o aumento mais evidente de peso. Por outro lado, o HSI e VSI fornecem indicações acerca da forma como alimento ingerido é utilizado, relacionando o aumento de massa do fígado (um dos principais órgãos de metabolização) e das vísceras, com as exigências metabólicas do organismo (Querol et al., 2002; Sanches et al., 2014). No decorrer desta experiência com linguados, forneceu-se diariamente uma dose fixa de ração (correspondente a cerca de 3% do peso corporal médio dos indivíduos), que foi ajustada semanalmente tendo em conta o aumento de peso dos linguados. De acordo com outros estudos (Fernández-Montero et al., 2017; Kausar e Salim, 2006; Lah et al., 2018) os organismos em condições de *stress* (como é o caso de estarem sujeitos a aquecimento e acidificação) têm o metabolismo mais acelerado, o que leva a um aumento do consumo de alimento para compensar os gastos energéticos. Em condições de aquecimento, pode ocorrer uma acumulação de reservas energéticas no fígado, levando ao aumento do HSI, como foi o caso deste estudo. Além disso, foi notória a influência do aquecimento na diminuição da massa das vísceras (consequente diminuição do VSI), o que se traduziu também na diminuição do teor de gordura nos linguados em estudo. De igual modo, o estudo realizado por Anacleto et al. (2018) corrobora os resultados obtidos, uma vez que, o aquecimento levou à diminuição do índice visceral, indicando ainda que o VSI pode estar diretamente relacionado com a redução do teor de gordura, o que não é surpreendente uma vez que a temperatura pode influenciar a composição corporal do pescado através da alteração da estabilidade estrutural de alguns compostos, nomeadamente lípidos e proteínas (Fang et al., 2010). Outros autores, como Couto et al. (2008) e Huang et al. (2016), demonstraram também que o VSI aumenta com a diminuição da temperatura, o que pode estar relacionado com o depósito de glicogénio e lípidos no fígado. Vários estudos demonstraram que estes índices de condição podem ser afetados pelas condições ambientais, e também pela alimentação, ciclo reprodutivo e sexo (Tavares-Dias et al., 2000).

Em termos de composição química aproximada, observou-se que o aquecimento e a acidificação influenciaram os teores dos vários macronutrientes presentes no músculo do linguado juvenil, com exceção dos teores de proteína e glicogénio e valor energético. Particularmente, o aumento da temperatura levou a um aumento significativo do teor de humidade e cinza, ao passo que a combinação deste efeito com acidificação levou à diminuição do teor de gordura. No estudo feito por Anacleto et al. (2018) utilizando o sargo comum (*Diplodus sargus*) como

modelo biológico, também se observou o aumento do teor de cinza nos indivíduos expostos ao aquecimento da água do mar, no entanto o teor de proteína aumentou. Quando exposto a condições de *stress*, o músculo do peixe torna-se mais magro ficando este tecido apenas com lípidos estruturais, uma vez que os lípidos que constituem as reservas energéticas dos animais são canalizados para a realização de diversas atividades biológicas, como o crescimento e a maturação das gónadas (García-Guerrero et al., 2003). Por outro lado, temperaturas mais elevadas podem também favorecer a conversão metabólica de lípidos em hidratos de carbono (Windisch et al., 2011). Contrastando o padrão observado no presente estudo, Flores-Vergara et al. (2004) evidenciaram um aumento do teor lipídico e diminuição dos teores de proteína e hidratos de carbono na ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) sujeita a temperaturas elevadas. Noutro estudo realizado por Anacleto et al. (2014), também realizado numa espécie de bivalve (*Ruditapes philippinarum*), o teor de proteína aumentou significativamente com o aumento da temperatura. Contudo, no estudo realizado por Tropea et al. (2015) em camarões (*Neocaridina heteropoda*), após exposição durante 90 dias a temperaturas elevadas, não se observaram diferenças no teor de proteína. Segundo Tate et al. (2017) o gastrópode marinho (*Dicathais orbita*) exposto ao aquecimento e acidificação revelou uma diminuição acentuada do teor de proteína, no entanto, o mesmo padrão não foi reportado por Lah et al. (2018), isto é, não se observaram diferenças significativas na composição nutricional do caracol marinho (*Turbo militaris*) exposto a estes dois fatores de *stress*. A análise destes estudos sugere então que os efeitos do aquecimento e acidificação da água do mar na composição nutricional do pescado variam consoante a espécie (isto é, parece haver efeitos diferenciais nas espécies de peixes, bivalves, gastrópodes e crustáceos), o que estará certamente relacionado com a sua tolerância fisiológica, metabolismo e estado nutricional.

Um dos parâmetros que define a qualidade nutricional do pescado é o perfil de ácidos gordos, o qual pode variar de acordo com o teor de gordura, estado fisiológico, idade, entre outros (Huss, 1995; Kołakowska e Sikorski., 2003; Tocher, 2003). Contudo, um dos fatores que mais afeta a composição lipídica do pescado é o alimento que está naturalmente disponível (em ambiente selvagem) ou que lhe é fornecido (em ambiente de aquacultura; Tocher, 2003). Como tal, foi determinado o perfil de ácidos gordos da ração fornecida aos linguados juvenis (Anexo III), a qual foi preparada com base nos requisitos nutricionais da espécie e seu estado de desenvolvimento. De um modo geral, e como observado em Anacleto et al. (2014), Barbosa et al. (2017) e Lah et al. (2018), o pescado tem um baixo teor de ácidos gordos saturados comparativamente aos insaturados. O mesmo se verificou no perfil de ácidos gordos do linguado juvenil em estudo. Embora o perfil possa ser afetado pelos fatores anteriormente indicados, os SFA principais detetados no músculo do linguado foram o ácido palmítico (C16:0; PA), seguido do ácido esteárico (C18:0; SA) e do ácido mirístico (C14:0; MA). Os MUFA principais foram o ácido oleico (18:1 n-9), seguido do palmitoleico (16:1 n-7; PA), ao passo que os PUFA predominantes foram os com a configuração ω 3, nomeadamente o EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3).

Os resultados obtidos nos diferentes cenários de alterações climáticas aos quais os linguados estiveram sujeitos, indicaram que o aquecimento e acidificação da água do mar, isoladamente ou combinados, podem levar à diminuição da qualidade nutricional em termos de composição lipídica. Por outras palavras, observou-se uma inversão nos somatórios de ácidos gordos, passando os SFA a estar em maior concentração, seguidos dos PUFA e MUFA, sendo que esta alteração foi mais evidente no tratamento sujeito a aquecimento. Estas alterações refletem, em parte, o perfil lipídico da ração utilizada para alimentação dos linguados juvenis, isto porque a alimentação é um dos principais fatores que influencia o perfil de ácidos gordos. Por outro lado, esta inversão dos somatórios dos FAs poderá ter resultado da peroxidação lipídica decorrente

do *stress* inferido (e, conseqüentemente, do estado fisiológico alterado) que terá levado à formação de radicais livres e conseqüente oxidação dos PUFA, resultando na sua conversão em SFA, alterando assim a fluidez da camada lipídica das membranas celulares (Dooremalen et al., 2011). Os PUFA são conhecidos por serem os constituintes principais dos lípidos polares dos peixes, sendo essenciais para manter a fluidez e permeabilidade da membrana lipídica quando sujeita a variações de temperatura, um fenômeno denominado adaptação homeoviscosa. Deste modo, com o aumento de temperatura, a membrana é reestruturada ao nível dos fosfolípidos, colesterol e ácidos gordos polinsaturados, de forma a manter a sua fluidez constante (Anacleto et al., 2014; Dooremalen et al., 2011; Lah et al., 2018). Nos tratamentos correspondentes aos efeitos das alterações climáticas, os principais SFA foram o C16:0, seguido de C18:0 e por último o C14:0. Nos estudos realizados por Anacleto et al. (2014) e Barbosa et al. (2017), em amêijoia japonesa e robalo, respetivamente, o SFA obtido em maior concentração também foi o C16:0, sendo que maiores concentrações deste composto estão geralmente associadas a elevadas taxas de crescimento animal. Por oposição, noutros estudos realizados em peixes marinhos, o SFA presente em maior concentração foi o C18:0 (Akhtar et al., 2014; Skalli et al., 2006). Os principais MUFA detetados foram o C18:1 n-9 (OA) e C16:1 n-7 (PA), assim como descrito por Oehlenschläger (1997). No caso dos PUFA, o C18:2 n-6 (LA) esteve presente em maior concentração, seguido do C22:6 n-3 (DHA) e C20:5 n-3 (EPA), e por fim do C18:3 n-3 (ALA), mostrando que houve uma diminuição na bioconversão de ALA a EPA e DHA. O mesmo padrão foi observado por Norambuena et al. (2016) no salmão do Atlântico e por Mellerrey et al. (2016) na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a temperaturas elevadas. No caracol marinho (*Turbo militaris*) exposto aos efeitos das alterações climáticas também se observaram diferenças significativas na composição lipídica, nomeadamente o aumento da percentagem de SFA e diminuição de PUFA, assim como a diminuição da razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ (Lah et al., 2018). Muitos estudos também revelaram esta diminuição da percentagem de PUFA e aumento de SFA devido ao aquecimento (Anacleto et al., 2014; Martino e Cruz, 2004; Mateos et al., 2010; Valles-Regino et al., 2015). Além disso, Coleman et al. (2018) observou que no sargo-dourado (*Acanthopagrus australis*), a concentração de PUFA era menor, nomeadamente, de C20:4 n-6, EPA e DHA, que são compostos mais suscetíveis ao efeito da temperatura. No entanto, nesses mesmos estudos verificaram-se elevadas concentrações de C18:2 n-6, ao passo que os teores de MUFA em regra não sofriam alterações.

A razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ constitui um indicativo dos benefícios nutricionais de um determinado alimento. Segundo o Departamento de Saúde do Reino Unido, a proporção destes dois tipos de ácidos na alimentação humana deve ser no máximo de 1 para 4, ou seja a razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ deve ser no mínimo de 0,25 (Milinsk et al., 2003). De um modo geral, na dieta ocidental o consumo de ácidos gordos do tipo $\omega6$ é muito elevado, o que faz com que a razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ seja desequilibrada (Simopoulos, 2016). Deste modo, o consumo de pescado, normalmente rico em ácidos gordos do tipo $\omega3$ pode ajudar a equilibrar esta razão. O fato de neste estudo a razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ ter sido baixa (inferior a 1) nos linguados expostos a aquecimento e acidificação, atuando tanto isoladamente ou em combinação, revelou que esta espécie não constitui uma boa fonte de ácidos gordos $\omega3$. Os resultados obtidos por Coleman et al. (2018) e Lah et al. (2018) estão em concordância aos obtidos no presente estudo, isto é, também revelaram razões $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$ inferiores a 1. Isto demonstra que, de fato o aquecimento e acidificação podem levar à alteração da qualidade nutricional do linguado *Solea senegalensis*, uma vez que a diminuição da concentração dos PUFA (principalmente EPA e DHA) promovida por estes fatores de *stress* resultou em valores baixos para a razão $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$. Outra forma de identificar a qualidade nutricional do pescado é através dos índices IA, IT, e h/H, e o somatório dos ácidos gordos EPA+DHA, pelo que os níveis baixos encontrados nos índices IA, IT e h/H, e os elevados teores do Σ EPA+DHA são indicativos de uma boa qualidade nutricional do linguado no início da experiência. Porém, em

condições de aquecimento, ocorreu um aumento significativo do IA e IT, ao passo que o somatório dos ácidos gordos EPA e DHA diminuiu significativamente quando os linguados foram expostos a aquecimento ou acidificação isoladamente. Por outro lado, o índice h/H foi significativamente reduzido pelo aquecimento e acidificação (isolados e/ou combinados). Uma vez que o EPA e DHA são componentes indispensáveis para a saúde humana e sendo o pescado a principal fonte natural destes componentes, a sua ingestão é recomendada de forma a prevenir várias patologias, como a obesidade, doenças coronárias, doenças cardiovasculares e reações inflamatórias (Barbosa et al., 2017; Simopoulos, 2002). Contrariamente ao obtido no presente estudo, Barbosa et al. (2017) e Akhtar et al. (2014) observaram aumentos consideráveis de EPA+DHA sob o efeito de aquecimento. Estes resultados sugerem então que num cenário futuro de alterações climáticas, em que se prevê que a temperatura da água do mar aumente e o pH diminua, poderá ocorrer alguma perda da qualidade nutricional do linguado *Solea senegalensis*, o que se refletirá naturalmente em menores benefícios para o consumidor, e consequentemente terá implicações na saúde humana. Como indicado pelo cálculo da DDR dos ácidos gordos (i.e. EPA+DHA, $\Sigma\omega3$ e $\Sigma\omega6$), o aquecimento e acidificação alteraram a qualidade nutricional no que respeita ao perfil de ácidos gordos do linguado (*Solea senegalensis*). Os tratamentos em que os fatores abióticos atuaram isoladamente (i.e. aquecimento e acidificação) conduziram a uma redução da percentagem de DDR para adultos tanto de EPA+DHA, como de $\Sigma\omega3$ e $\Sigma\omega6$. No caso das crianças, a diminuição foi mais acentuada nestes ácidos gordos quando o aquecimento atuou sozinho. No entanto, a combinação do aquecimento com a acidificação, somente conduziu à diminuição da DDR de $\Sigma\omega3$ para adultos comparativamente ao tratamento controlo. Para uma alimentação saudável e equilibrada é indispensável a presença de ácidos gordos polinsaturados ($\omega3$ e $\omega6$), uma vez que, o organismo humano não consegue sintetizá-los, sendo, por isso, imperável obtê-los através da alimentação (Simopoulos et al., 2002).

O pescado é uma boa fonte de elementos essenciais, e, desta forma, o presente trabalho permitiu demonstrar a importância de se avaliar os efeitos das alterações climáticas nos teores de minerais do pescado, uma vez que as condições abióticas (temperatura, pH e mesmo a salinidade) não só têm um papel importante no valor nutricional das espécies de pescado (como se viu neste trabalho), como afetam também a especiação, disponibilidade e toxicidade dos minerais no meio aquático (Marques et al., 2010; Maulvault et al., 2019b). No presente estudo, observou-se que o aquecimento e acidificação não levaram a grandes variações no teor de macro e microelementos, sendo apenas o Zn afetado significativamente pelo aquecimento. É importante referir que o zinco é um dos microelementos mais importantes na nutrição do peixe, uma vez que está envolvido em inúmeras funções metabólicas (Carpene et al., 2003; Watanabe et al., 1997), e este elemento pode variar em função da idade, estado de desenvolvimento, estação do ano e ciclo reprodutivo (Carpene et al., 2003). Um estudo realizado por (Kaushik, 2001) revelou ainda que este mineral tem um papel protetor contra a auto-oxidação em salmonídeos. Para além disso, assistiu-se também à diminuição acentuada dos teores de Na e Fe e aumento de K ao longo do tempo, isto é, após os 61 dias do ensaio. No entanto, este aumento não se pode correlacionar com os cenários de alterações climáticas uma vez que ocorreu de forma semelhante no controlo. Um estudo realizado por Barbosa et al. (2017) demonstrou que o aquecimento diminuía o teor de alguns minerais no músculo (p.e. K, cálcio – Ca e estrôncio - Sr) e fígado (p.e. enxofre - S, Ca, K, Fe e cloro - Cl) do robalo (*Dicentrarchus labrax*), no entanto, aumentou o teor de Zn e As no músculo e o teor de Cu no fígado. Do mesmo modo, Coleman et al. (2019) ao estudar o efeito das alterações climáticas na qualidade nutricional do sargo-dourado (*Acanthopagrus australis*) observou que a temperatura diminuiu significativamente o teor de Cu, e aumentou significativamente o teor de As (permanecendo dentro dos limites de segurança), nos restantes elementos não se observaram alterações relevantes nos teores de minerais. Já num estudo

realizado com o caracol marinho (*Turbo militaris*) exposto ao aquecimento e acidificação, observaram-se alterações significativas nos teores de Zn e Fe (Lah et al., 2018), sendo os resultados em relação ao Zn concordantes com o presente estudo. Apesar de alguns minerais serem indispensáveis para o desenvolvimento e manutenção do organismo, quando ingeridos em doses excessivas podem tornar-se tóxicos (p.e. Cu, Fe, Zn) e representar um perigo para a saúde humana. No entanto, neste estudo observou-se que os teores de minerais obtidos mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos (Walker et al., 2005).

De um modo geral, não existem muitos estudos recentes que demonstrem de que forma os peixes marinhos regulam o seu teor de minerais (McMeans et al., 2007). No presente estudo, a falta de um padrão que permitisse relacionar os efeitos das alterações climáticas com as variações verificadas nos teores dos vários minerais analisados poderá estar relacionada com o facto do teor de minerais poder ser influenciado por muitos fatores, tais como, a espécie, o sexo, a idade, o tamanho, o alimento disponível, não sendo possível padronizar e estabelecer valores médios para cada mineral (Lall, 1995; Martínez-Valverde et al., 2000; Oehlenschläger, 1997). Contudo, existem alguns estudos que relatam que o teor de minerais e o comprimento dos animais são inversamente proporcionais, e esta relação pode estar associada à necessidade adicional de alguns minerais durante a fase de crescimento dos organismos, ou no decorrer de uma alteração da sua dieta (Fabris et al., 2006; Farkas et al., 2003; McMeans et al., 2007). Este argumento é concordante com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que se verificaram diminuições significativas nos teores de alguns elementos essenciais (Na e Fe) ao longo do tempo. Relativamente ao ferro, o seu papel na resistência à infeção e nas interações imunológicas em peixes ainda é um assunto bastante pouco desenvolvido, uma vez que os sinais de deficiência em ferro revelam-se tardiamente, e também, porque a dose para suprir a necessidade nutricional de ferro no pescado é baixa (Naser, 2000). No caso do Na, este é necessário para a regulação do equilíbrio interno dos peixes, pois participa na bomba de sódio e potássio, permitindo a troca de iões K do meio externo por iões Na intracelulares (Holmgren et al., 2000).

Como indicado pelo cálculo da DDR dos macro e microelementos, as alterações de temperatura e pH alteraram a qualidade nutricional no que respeita ao perfil mineral do linguado (*Solea senegalensis*). Verificou-se que no macroelemento Na, a DDR foi afetada pelos dois fatores de *stress* em estudo (temperatura e pH). Este macroelemento tem funções fulcrais no organismo, como, ser indispensável na manutenção da pressão osmótica no meio extracelular, e na regulação da pressão sanguínea e frequência cardíaca. (Lukaski, 2004). Relativamente à DDR dos microelementos, verificou-se que a DDR do Zn foi afetada positivamente pelo aquecimento. Este microelemento desempenha um papel importante na coordenação e crescimento celular (Reilly, 2004).

Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste estudo foi possível observar que o linguado *Solea senegalensis* é suscetível a alterações nutricionais quando exposto a cenários de alterações climáticas. Observou-se que o aquecimento atuando isoladamente contribuiu para o aumento significativo de muitos dos parâmetros em estudo, nomeadamente do peso, dos índices K, HSI, IA e IT, do teor de humidade, do Σ SFA (principalmente C16:0 e C18:0) e da concentração de Zn, no entanto promoveu a diminuição significativa de outros parâmetros (VSI, TCR, Σ MUFA (particularmente de PA e EA), PUFA (mais acentuado nos teores de LA, ALA, EPA e DHA), $\Sigma\omega 3$, $\Sigma\omega 6$, $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$, EPA+DHA e h/H). Por outro lado, a acidificação atuando sozinha contribuiu essencialmente para o decréscimo de alguns parâmetros (TCR, alguns MUFA (p.e. PA e EA) e PUFA (p.e. LA, ALA, EPA e DHA), $\Sigma\omega 3$, $\Sigma\omega 6$, h/H, $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$ e EPA+DHA), tendo contribuído apenas para o aumento do teor do Σ SFA (principalmente C14:0, C16:0 e C18:0). A combinação dos dois fatores de *stress* (i.e. Acidificação+Aquecimento) resultou no aumento significativo apenas do peso e TCR, e na diminuição significativa do HSI, do teor de gordura, da concentração de C22:1 n-9, EPA, DHA, $\Sigma\omega 3$, h/H, EPA+DHA e $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$. Entre os tempos experimentais (T_0 e T_{61}), observou-se o efeito dos tratamentos de simulação das alterações climáticas no aumento significativo do peso, comprimento, índices K, HSI e VSI, teores de cinza e glicogénio, e concentração de K, ao passo que ocorreu uma diminuição do teor de humidade (apenas no controlo do tempo final) e dos níveis de Na e Fe. Certos parâmetros como a TCEp, os teores de proteína e glicogénio, o valor de energia, e a concentração dos minerais Mg, P, Cu e Mn, não sofreram alterações significativas quer entre tempos experimentais, quer entre tratamentos. Verificou-se, deste modo, que os efeitos simulados de alterações climáticas contribuíram para uma ligeira melhoria na qualidade nutricional relativamente ao teor de Zn, teores de humidade e dos ácidos gordos ALA e LA, ocorrendo melhorias em termos de produção do linguado, uma vez que não houve mortalidade durante a experiência e a nível das taxas de crescimento (TCR) ocorreu também um aumento nos tratamentos em estudo. No entanto, a composição lipídica do músculo do linguado revelou que esta espécie é grandemente afetada pelas condições de aquecimento e acidificação, nomeadamente na conversão de PUFA em SFA, na diminuição do teor de MUFA, EPA e DHA e ainda da razão $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$, e no aumento dos índices de qualidade IA e IT. Deste modo, um dos principais impactos negativos do aquecimento e acidificação é a perda de qualidade do linguado em termos de redução de EPA, DHA e $\Sigma\omega 3/\Sigma\omega 6$, podendo representar riscos para a saúde humana, uma vez que o pescado é a principal fonte destes nutrientes essenciais e a sua ingestão em doses

inadequadas pode levar a problemas graves a nível cardiovascular e cerebral e num maior risco de aparecimento de doenças coronárias.

Em trabalhos a serem realizados no futuro, seria importante incluir outros compostos, como vitaminas, como o α -tocoferol, colesterol, assim como outros elementos essenciais como o selénio, iodo e cálcio. Por outro lado, também seria relevante analisar os elementos tóxicos, como o mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio, de forma a avaliar a segurança alimentar, isto é verificar se o consumo desta espécie em condições de alterações climáticas poderá constituir um risco de saúde pública. Também seria interessante observar o efeito das alterações climáticas focando noutras espécies com características biológicas, fisiológicas e comportamentais distintas, inclusive os seus hábitos alimentares (como por exemplo, pelágicos, carnívoros ou herbívoros). Uma vez que as alterações climáticas não se limitam à temperatura e pH, seria interessante estudar ainda a interação entre estes dois fatores de *stress* e outros relacionados diretamente (*p.e.* hipóxia, UVs, salinidade) ou indiretamente (*p.e.* eutrofização, co-exposição a contaminantes químicos e biológicos) com as alterações climáticas. Ainda de modo a ter uma visão mais específica e aprofundada das alterações a nível do metabolismo do linguado ou outra espécie de aquacultura revelante, seria interessante utilizar ferramentas inovadoras ao nível molecular, como por exemplo, de proteómica e metabolómica, tais como, ionização e dessorção a laser assistida por matriz - analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF), cromatografia líquida de alta precisão - espectrometria de massa (HPLC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Referências Bibliográficas

- Adrian, J., Potus, J., Poiffat, A., Dauvillier, P. (2000). Cumpuestos nitrogenados. In: Adrian, J., Potus, J., Poiffat, A., Dauvillier, P. (Eds). *Análisis nutricional de los alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, 41-43. ISBN: 978-84-200-0919-3.
- Agrawala, S., Moehner, A., El Raey, M., Conway, D., van Aalst, M., Hagenstad, M., Smith, J. (2004). Development and Climate Change in Egypt: Focus on Coastal Resources and the Nile. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, **36**(1), 68.
- American Heart Association (2017). Fish and Omega-3 Fatty Acids. Consultado a: 29/08/2019. Disponível em: <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/fats/fish-and-omega-3-fatty-acids>.
- Akhtar, M.S., Pal, A. K., Sahu, N. P., Ciji, A., Mahanta, P.C. (2014). Higher acclimation temperature modulates the composition of muscle fatty acid of *Tor putitora* juveniles. *Weather and Climate Extremes*, **4**, 19–21. DOI: 10.1016/j.wace.2014.03.001.
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Bandarra, N.M., Repolho, T., Nunes, M.L., Rosa, R., Marques, A., (2014). Effect of warming on protein, glycogen and fatty acid content of native and invasive clams. *Food Research International*. **64**, 439–445. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.023.
- Anacleto, P., Figueiredo, C., Baptista, M., Maulvault, A.L., Camacho, C., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R. (2018). Fish energy budget under ocean warming and flame retardant exposure. *Environmental Research*, **164**, 186–196. DOI: 10.1016/j.envres.2018.02.023.
- Andrade, G.Q., Bispo, E.S., Druzian, J.I. (2009). Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**(4), 721–726.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. In: Latimer, G., Horwitz, W. (Eds.), AOAC, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, 3000.
- Araújo, C.C., Flynn, M.N., Pereira, W., Luiz, R. (2011). Indicadores de qualidade da água e biodiversidade do Rio Jaguari-Mirim no trecho entre as pequenas centrais hidrelétricas de São José e São Joaquim, São João da Boa Vista, São Paulo. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, **4**(2), 19-35.
- Arrigo, K.R. (2007), Carbon cycle: marine manipulations, *Nature*, **450**(7169), 491–492. DOI: 10.1038/450491a.
- Asensio, E., Forné, I., Cerdà, J., Agulleiro, M.J., Abián, J. (2009). 2-D DIGE analysis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) testis proteome in wild-caught and hormone-treated F1 fish. *Proteomics*, **9**(8), 2171–2181. DOI: 10.1002/pmic.200800696.
- Azevedo, A.M., Vázquez, S., Quiroga, M.I., Losada, A.P., Barreiro, A. (2019). Skeletal Anomalies in Senegalese Sole (*Solea senegalensis*), an Anosteocytic Boned Flatfish Species. *Veterinary Pathology*, **56**(2), 307-316. DOI: 10.1177/0300985818800027.
- Bai, P., Dong, S., Zheng, Z., Li, M., Jin, C. (2008). Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *Miichthys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture International*, **16**(6), 581–589. DOI: 10.1007/s10499-008-9169-7.

- Bandarra, N. M., Calhau, M.A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M.G., Bártolo, H., Faria, M.R., Fonseca, M.C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M.L., (2004). Composição e Valor Nutricional dos Produtos da Pesca mais Consumidos em Portugal. *Publicações avulsas do IPIMAR*, **11**, 103.
- Barbosa, V. Maulvault, A.L., Alves, R.N., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Carvalho, M.L., Nunes, M.L., Rosa, R., Marques, A. (2017). Will seabass (*Dicentrarchus labrax*) quality change in a warmer ocean? *Food Research International*, **97**, 27–36. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.03.024.
- Batista, A.C., Dias, J., Guedes, C.M., Silva, S.R., Rema, P., Rodrigues, V., Loureiro, N. (2016). *In vivo* assessment of fat composition in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) by real-time ultrasonography and image analysis of subcutaneous fat. *Aquaculture*, **456**, 76–82. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.009.
- Berdal, B., Blust, R., Brix, O., Colosimo, A., Wachter, B. De, Giuliani, A., Zakhartsev, M. (2001). Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Continental Shelf Research*, **21**, 1975–1997. DOI: 10.1016/S0278-4343(01)00038-3.
- Belitz, H.D., Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. 2ª Edição. Springer (Ed) Alemanha, 992.
- Biezanowska-Kopec, R., Pysz, M., Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Smolen, S., Koronowicz, A., Piotrowska, E., Rakoczy, R., Skoczylas, Ł., Leszczynska, T., (2016). The effects of peeling and cooking on the mineral content and antioxidant properties in carrots enriched with potassium iodate and/or selenite (SeIV) and selenite (SeVI). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **67**(8), 919–928. DOI: 10.1080/09637486.2016.1205550.
- Bignami, S., Sponaugle, S., Cowen, R.K. (2014). Effects of ocean acidification on the larvae of a high-value pelagic fisheries species, mahi-mahi *Coryphaena hippurus*. *Aquatic Biology*, **21**, 249–260. DOI: 10.3354/ab00598.
- Bondia-Pons, I., Moltó-Puigmartí, C., Castellote, A. I., López-Sabater, M. C. (2007) Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1157**(1-2), 422–429. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.020.
- Borges, P.A.C. (2015). Towards the Understanding of Senegalese Sole Lipid Metabolism Towards the Understanding of Senegalese Sole Lipid Metabolism (Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 1-151.
- Borges, P., Medale, F., Dias, J., Valente, L.M.P. (2013). Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio. *British Journal of Nutrition*, **109**(8), 1373–1381. DOI: 10.1017/S0007114512003418.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L.M.P. (2009). Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British Journal of Nutrition*, **102**(7), 1007–1014. DOI: 10.1017/S0007114509345262.
- Burch, R.E., Hahn, H.K.J., Sullivan, J.F. (1975). Newer Aspects of the Roles of Zinc, Manganese, and Copper in Human Nutrition. *Clinical Chemistry*, **21**(4), 501-520.
- Burke, L., Reynter, K., Spalding, M., Perry, A. (2011). *Reefs at Risk Revisited*, 114, World Resources Institute, 1-130. ISBN 978-1-56973-762-0.

- Burrows, M.T., Moore, P.J., Poloczanska, E.S., Thompson, S.A., Schwing, F., Brown, C.J., Sydeman, W.J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. *Nature Climate Change*, **3**(10), 919–925. DOI: 10.1038/nclimate1958.
- Braga, F.M.S. (1986). Estudo entre o fator de condição e relação peso-comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, **46**(2), 339-346.
- Caldeira, K., Wickett, M. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, **110**(9), 1–12. DOI: 10.1029/2004JC002671.
- Carpene, E., Andreani, G., Monari, M., Kindt, M., Isani, G. (2003) Biochemical changes during post-larval growth in White Muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed zinc-fortified diets. *Veterinary Research Communications*, **27**, 215-218.
- CE (2010) Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L276/33.
- Celik, U., Oehlenschläger, J. (2004). Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry*, **87**, 343–347. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.11.018.
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni, R.B., Piao, S., Thornton, P. (2014). Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 465-570.
- Claiborne, J.B. (1998). Acid–base regulation. *The Physiology of Fishes*, In: Evans, D.H. (Ed.), 177–198. ISBN: 0-8493-8427-3.
- Clements, J.C., Hicks, C., Tremblay, R., Comeau, L.A. (2018). Elevated seawater temperature, not pCO₂, negatively affects post-spawning adult mussels (*Mytilus edulis*) under food limitation. *Conservation Physiology*, **6**(1), 1-14. DOI: 10.1093/conphys/cox078.
- Coleman, M.A., Butcherine, P., Kelaheer, B.P., Broadhurst, M.K., March, D.T., Provost, E.J., David, J., Benkendorff, K. (2018). Climate change does not affect the seafood quality of a commonly targeted fish. *Global Change Biology*, **25**, 699–707. DOI: 10.1111/gcb.14513.
- Collins, M., An, S-I, Cai, W., Ganachaud, A., Guilyardi, E., Jin, F-F, Jochum, M. Lengaigne, M., Power, S., Timmermann, A., Vecchi, G., Wittenberg, A. (2010). The impact of global warming on the tropical Pacific Ocean and El Niño. *Nature Geoscience*, **3**, 391–397. DOI: 10.1038/ngeo868.
- Couto, A., Enes, P., Peres, H., Oliva-Teles, A. (2008). Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, **151**, 45–50. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.05.013.
- Crossgrove, J., Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine*, **17**, 544–553. DOI:10.1002/nbm.931.
- Dayhuff, L.E., Wells, M.J.M. (2005). Identification of fatty acids in fishes collected from the Ohio River using gas chromatography-mass spectrometry in chemical ionization and electron impact modes. *Journal of Chromatography A*, **1098**(1–2), 144–149. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.049.

- Dale, B., Edwards, M., Reid, P.C. (2006). Climate change and harmful algal blooms. *Ecological Studies*, **189**, 67–378.
- De Silva, S.S., Anderson, T.A. (1995). Fish nutrition in aquaculture. Chapman and Hall, **1**, 319. ISBN: 978-0-412-55030-0.
- Devol, A., Warner, M., Krembs, C., Newton, J., Sabine, C.L., Feely, R.A., Maloy, C. (2010). The combined effects of ocean acidification, mixing, and respiration on pH and carbonate saturation in an urbanized estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **88**(4), 442–449. DOI: 10.1016/j.ecss.2010.05.004.
- Dimaltrans (2019). Lenguado fino: *Solea senegalensis*. Consultado a: 05/08/2019. Disponível em: <http://www.dimaltrans.com/productos/lenguado-fino-solea-senegalensis/>.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F. Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, **176**, 27-38.
- Dinis, M., Sarasquete, C. (1999). Culture of Sole, *Solea senegalensis* Kaup. Histomorphological and Histopathological Aspects. *Patología*, 95-105.
- Dooremalen, C.V., Koekkoek, J., Eilers, J. (2011). Temperature-induced plasticity in membrane and storage lipid composition: thermal reaction norms across five different temperatures. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 285–291. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.018.
- Drago, S., Valencia, M. (2002). Effect of fermentation on iron, zinc, and calcium availability from iron-fortified dairy products. *Journal of Food Science*, **67** (8), 3130–3134. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08870.x.
- EFSA, (2010). Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA); Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, **8**(3), 1-107.
- EFSA, (2017). Dietary reference values for nutrients: Summary report. *EFSA Journal*, **14**(2), 1-92.
- Emsley, J. (2013). In Your Element: Manganese the protector. *Nature Chemistry*, **5**(11), 978. DOI: 10.1038/nchem.1783 .
- Esbaugh, A.J., Heuer, R., Grosell, M. (2012). Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid–base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *Journal of Comparative Physiology B*, **182**(7), 921–934. DOI: 10.1007/s00360-012-0668-5.
- Esbaugh, A.J., Ern, R., Nordi, W.M., Johnson, A.S. (2016). Respiratory plasticity is insufficient to alleviate blood acid–base disturbances after acclimation to ocean acidification in the estuarine red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Comparative Physiology B*, **186**, 97–109.
- Fabris, G., Turoczy, N.J., Stagnitti, F. (2006). Trace metal concentration in edible tissue of snapper, flathead, lobster, and abalone from coastal waters of Victoria, Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**, 286-292. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.006.
- Fang, J., Tian, X., Dong, S. (2010). The influence of water temperature and ration on the growth, body composition and energy budget of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*, **299**, 106–114. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.026.
- FAO (1995). The state of food and agriculture: Agricultural trade: entering a new era? Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 21. ISBN: 92-5-103700-0.
- FAO (1996). The state of food and agriculture: Food security: some macroeconomic dimensions.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 29. ISBN: 92-5 103858-9.
- FAO (1998). Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21–30. ISBN: 92-4-154612-3.
- FAO (2018a). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals*, Rome, Italy, 227. ISBN: 978-92-5-130562-1.
- FAO (2018b). *Impacts of climate change on fisheries and aquaculture – Synthesis of current knowledge, adaptation and mitigation options*, Rome, Italy, 654. ISBN: 978-92-5-13067-9.
- Farkas, A., Salanki, J., Specziár, A. (2003). Age- and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a lowcontaminated site. *Water Research*, **37**, 959-964. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00447-5.
- Fernandes, T.J.R., Alves, R.C., Souza, T., Silva, J.M.G., Castro-Cunha, M., Valente, L.M.P. (2012). Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. *Food Chemistry*, **134**(3), 1337-1342. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.026.
- Fernández, I., Pimentel, M.S., Ortiz-Delgado, J.B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, **295**(3–4), 250–265. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.046.
- Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J. (2007). Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **17**(4), 581-613. DOI: 10.1007/s11160-007-9059-5.
- Filipe, S. (2015). Impacto da acidificação dos oceanos no desenvolvimento embrionário e larvar de peixes marinhos (Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Aquacultura e Pescas). *Instituto Politécnico de Leiria, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar*. 1-108.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Ceron-Ortiz, A.N., Arredondo-Vega, B.O. (2004). Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*, **35**(12), 1131–1140. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01136.x.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497–509.
- Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **94**, 4312–4317. DOI: 10.1073/PNAS.94.9.4312.
- Foss, A., Rønnes, B.A., Øiestad, V. (2003). Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture*, **220**, 607–617. DOI: 10.1007/s11160-004-8360-9.
- Furlong, E.B., Bastos, A.L., Baish, A.L.M. (2006). Chemical characterization of fish species employed to Asthma treatment southern region of Rio Grande do Sul. *Ciências Agrárias*, **27**(3), 415–422.
- García-Guerrero, M., Villarreal, H., Racotta, I.S. (2003). Effect of temperature on lipids, proteins,

- and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **138**, 147–154. DOI: 10.1016/S1095-6433(02)00354-9.
- Gharibzadeh, S.M.T., Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation, *Trends in Food Science & Technology*. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.017.
- Gnaiger, E. (1983) Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. *In: Polarographic Oxygen Sensors*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 337–345. ISBN: 978-3-642-81865-3.
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W. (2001). Toxic effects of metals. *In: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, New York, 811 -867. ISBN: 0-07-134721-6.
- Green, L., Jutfelt, F. (2014). Elevated carbon dioxide alters the plasma composition and behaviour of a shark. *Biology Letters*, **10**(9), 1-4. DOI: 10.1098/rsbl.2014.0538.
- Harley, C.D.G., Hughes, A.R., Hultgren, K.M., Miner, B.M., Sorte, J.B.C., Thornber, C.S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., Williams, L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, **9**(2), 228–241. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x.
- Hemre, G.I., Lambertsen, G., Lie, Ø. (1991). The effect of dietary carbohydrate on the stress response in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, **95**(3-4), 319–328. DOI: 10.1016/0044-8486(91)90097-Q.
- Heuer, R.M., Grosell, M. (2014). Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **307**(9), 1061–1084. DOI: 10.1152/ajpregu.00064.2014.
- Heuer, R.M., Welch, M.J., Rummer, J.L., Munday, P.L., Grosell, M. (2016). Altered brain ion gradients following compensation for elevated CO₂ are linked to behavioural alterations in a coral reef fish. *Scientific Reports*, **6**, 1-10. DOI: 10.1038/srep33216.
- Hinder, S.L., Hays, G.C., Edwards, M., Roberts, E.C., Walne, A.W., Gravenor, M.B. (2012). Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change. *Nature Climate Change*, **2**, 271–275. DOI: 10.1038/nclimate1388.
- Hiroi, J., McCormick, S.D. (2012). New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **184**, 257–268. DOI: 10.1016/j.resp.2012.07.019.
- Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E.S., Brewer, P.G., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V.J., Jung, S. (2014). The Ocean. *In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects*. Cambridge University Press, United Kingdom e New York, 1655-1731.
- Holmgren, M., Wagg, J., Bezanilla, F., Rakowski, R.F., De Weer, P., Gadsby, D.C. (2000). Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature*, **403**(6772), 898-901. DOI: 10.1038/35002599.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G. (1996). Principles of Biochemistry. *Prentice Hall*, United States of America, **21**(3), 165. ISBN: 0-13-042409-9.
- Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T.M., Waagbø, R., Olsen, A.B., Breck, O., Stefansson, S., Fivelstad, S. (2008) Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, **280**(1-

- 4), 146-153. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.05.009.
- Hu, F.B., Willet, W.C. (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *Journal of the American Medical Association*, **288**(20), 2569-2578. DOI: 10.1001/jama.288.20.2569.
- Huss, H.H., (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, **348**, 195. ISBN: 92-5-103507-5.
- Huang, J.F., Xu, Q.Y., Chang, Y.M. (2016). Effects of temperature and dietary protein on the growth performance and IGF-I mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*, **22**, 283–292. DOI: 10.1111/anu.12254.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., Lin, L.Y. (2011). Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **301**(1), 28–47. DOI: 10.1152/ajpregu.00047.2011.
- INE. (2018). Estatísticas da Pesca 2017. Edição 2018. Instituto Nacional de Estatística. Lisboa.
- IPCC (2007). Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P., van der Linden, P.J., Hanson, C.E. Eds., *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom, 976. ISBN: 978 0521 88010-7
- IPCC (2014). Summary for policymakers. In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C.B., Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, White, L.L. (eds.)]. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom and New York, 1-32. ISBN: 978-92-9169-143-2
- IPQ (2009a). NP 2282 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação da humidade. *Instituto Português da Qualidade*, Caparica, 7.
- IPQ (2009b). NP 2032 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de cinza total. *Instituto Português da Qualidade*, Caparica, 7.
- IPQ (2009c). NP 4488 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína. *Instituto Português da Qualidade*, Caparica, 8.
- IPQ (2009d). NP 1972 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de matéria gorda livre. *Instituto Português da Qualidade*, Caparica, 7.
- ISO/TC 34/SC 6N371 - International Organization for standardization. Determination of Total Phosphorus content - spectrometric method.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Kikkawa, T. (2008). Fishes in high-CO₂, acidified oceans. *Marine Ecology - Progress Series*, **373**, 295–302. DOI: 10.3354/meps07823.
- Jorhem, L. (2000). Determination of metals in food by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, **83**(5), 1204-1211.
- Kausar, R., Salim, M. (2006). Effect of water temperature on the growth performance and feed conversion ratio of *Labeo Rohita*. Department of Zoology and Fisheries, University of Agriculture, **26**(3), 105-108.

- Kaushik, S.J. (2001) Mineral nutrition. In: Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. *Springer-Praxis*, Publishing Ltd, Chichester, 169-181.
- Kehrig, H., Malm, O., Seixas, T.G. (2013). Selenium and mercury in widely consumed seafood from South Atlantic Ocean. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, **93**, 156-192. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.03.034.
- Khalili Tilami, S., Sampels, S. (2018). Nutritional Value of Fish: Lipids, Proteins, Vitamins, and Minerals. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, **26**(2), 243–253. DOI: 10.1080/23308249.2017.1399104.
- Kim, K.S., Shim, J.H., Kim, S. (2013). Effects of ocean acidification on the larval growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biogeosciences*, **10**, 7413–7431. DOI:10.5194/bgd-10-7413-2013.
- Kořakowska, A., Sikorski, Z.E. (2003). The role of lipids in food quality. In: Chemical and functional properties of food lipids, *CRC Press*, 1-8. ISBN 9780367383442.
- König, D., Muser, K., Dickhuth, H.H., Berg, A., Deibert, P. (2009). Effect of a supplement rich in alkaline minerals on acid-base balance in humans. *Nutrition Journal*, **8**, 23. DOI:10.1186/1475-2891-8-23.
- Kushi, L., Siscovick, D.S., King, I., Weinmann, S., Psaty, B.M., Raghunathan, T., Cobb, L.A. (2018). Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **71**(1), 208–212. DOI: 10.1093/ajcn/71.1.208s.
- Lachkar, Z. (2014). Effects of upwelling increase on ocean acidification in the California and Canary Current systems. *Geophysical Research Letters*, **41**(1), 90–95. DOI: 10.1002/2013GL058726
- Lah, R.L., Kelaher, B.P., Bucher, D., Benkendorff, K. (2018). Ocean warming and acidification affect the nutritional quality of the commercially-harvested turbinid snail *Turbo militaris*. *Marine Environmental Research*, **141**, 100-108. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.08.009.
- Lall, S.P. (1995). Macro and trace elements in fish and shellfish. In: Fish and fishery products. Composition, nutritive properties and stability, *Centre for Agriculture and Bioscience International*, 187-214.
- Leyva, A., Quintana, A., Sánchez, M., Rodríguez, E. N., Cremata, J., Sánchez, J. C. (2008). Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation. *Biologicals*, **36**(2), 134–141. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.09.001.
- Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**(5), 797-811. DOI: 10.1093/ajcn/63.5.797.
- Liu, J., Kummerow, C.D., Elsaesser, G.S. (2017). Identifying and analysing uncertainty structures in the TRMM microwave imager precipitation product over tropical ocean basins. *International Journal of Remote Sensing*, **38**(1), 23–42. DOI: 10.1080/01431161.2016.1259676.
- Lourenço, H.M., Afonso, C., Anacleto, P., Martins, M.F., Nunes, M.L., Lino, A.R. (2012). Elemental composition of four farmed fish produced in Portugal. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **63**(7), 853–859. DOI: 10.3109/09637486.2012.681632.
- Lukaski, H.C. (2004). Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition*, **20**

- (7), 632–644. DOI: 10.1016/j.nut.2004.04.001.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, **70**, 32–41. DOI:10.1016/j.seares.2012.03.002.
- Makridis, P., Martins, S., Tsalavouta, M., Dionisio, L.C., Kotoulas, G., Magoulas, A., Dinis, M.T. (2005). Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. *Aquaculture Research*, **36**(16), 1619–1627. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2005.01388.x.
- Mancardi, D., Tullio, F., Crisafulli, A., Rastaldo, R., Folino, A., Penna, C., Pagliaro, P. (2009). Omega 3 has a beneficial effect on ischemia/reperfusion injury, but cannot reverse the effect of stressful forced exercise. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **19**(1), 20–26. DOI: 10.1016/j.numecd.2008.01.004.
- Marques, J.F. (2013). *A vitamina K em combinação com outros marcadores bioquímicos no diagnóstico da osteoporose*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. 82.
- Marques, A., Nunes, M.L., Moore, S.K., Strom, M.S. (2010). Climate change and seafood safety: Human health implications. *Food Research International*, **43**(7), 1766-1779. DOI:10.1016/j.foodres.2010.02.010.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Santaella, M., Rós, R. (2000). The content and nutritional significance of mineral on fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chemistry*, **71**(4), 503-509. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00197-7.
- Martino, R.C., Cruz, G.M. (2004). Proximate composition and fatty acid content of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* along the year seasons. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **6**, 955–960. DOI: 10.1590/S1516-89132004000600015.
- Mateos, H.T., Lewandowski, P.A., Su, X.Q. (2010). Seasonal variations of total lipid and fatty acid contents in muscle, gonad and digestive glands of farmed Jade Tiger hybrid abalone in Australia. *Food Chemistry*, **123**(2), 436–441. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.062.
- Matos, J.P.S (2014). Influência da bioacessibilidade do selénio, mercúrio e metilmercúrio na identificação do benefício/perigo associado ao consumo de Tintureira crua e cozinhada. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 72.
- Maulvault, A.L. (2009). *Valor nutricional de algumas espécies consumidas em Portugal*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha - Especialização em Aquacultura e Pescas). Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve, 84.
- Maulvault, A.L., Barbosa, V., Alves, R., Custódio, A., Anacleto, A., Repolho, T., Pousão Ferreira, P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. (2017). Ecophysiological responses of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to increased temperature and dietary methylmercury. *Science of the Total Environment*, **586**, 551-558. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.016.
- Maulvault, A.L., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Camacho, C., Cunha, S., Diniz, M. (2018a). Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquatic Toxicology*, **202**, 65–79. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.06.016.
- Maulvault, A.L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Fogaça, F., Marques, A.

- (2018b). Assessing the effects of seawater temperature and pH on the bioaccumulation of emerging chemical contaminants in marine bivalves. *Environmental Research*, **161**, 236–247. DOI: 10.1016/j.envres.2017.11.017.
- Maulvault, A.L., Santos, L.H.M.L.M., Camacho, C., Anacleto, P., Barbosa, V., Alves, R., Marques, A. (2018c). Antidepressants in a changing ocean: Venlafaxine uptake and elimination in juvenile fish (*Argyrosomus regius*) exposed to warming and acidification conditions. *Chemosphere*, **209**, 286–297. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.004.
- Maulvault, A.L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Diniz, M.S. (2019a). Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification. *Environmental Research*, **169**, 7–25. DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.021.
- Maulvault, A.L., Anacleto, P., Marques, A., Rosa, R., Diniz, M. (2019b). *Chemical contaminants in a changing ocean*. In: *Ecotoxicology of Marine Organisms*. CRC Press. 375. ISBN: 1138035491.
- McMeans, B.C., Borgå, K., Bechtol, W.R., Higginbotham, D., Fisk, A.T. (2007). Essential and non-essential element concentrations in two sleeper shark species collected in arctic waters. *Environmental Pollution*, **148**(1), 281–290. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.10.039.
- McNeil, B.I., Sasse, T.P. (2016). Future ocean hypercapnia driven by anthropogenic amplification of the natural CO₂ cycle. *Nature*, **529**(7586), 383–386. DOI: 10.1038/nature16156.
- Menezes, M.E.S. (2006). Valor nutricional de Espécies de Peixes (água salgada e estuário) do Estado de Menezes. Dissertação para obtenção de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Menezes, Centro de Ciências exatas e naturais. 119p.
- Milinsk, M.C., Padre, R.G., Hayashi, C., Souza, N.E., Matsushita, M. (2003). Influence of diets enriched with different vegetable oils on the fatty acid profiles of *Helix aspersa maxima*. *Food Chemistry*, **82**, 553–558. DOI: 10.1007/s00217-005-1191-7.
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L.E.C. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, **6**, 1–37. DOI: 10.1111/raq.12091.
- Morgan, I.J., McDonald, D.G., Wood, C.M. (2001). The cost of living for freshwater fish in a warmer, more polluted world. *Global Change Biology*, **7**, 345–355. DOI:10.1046/j.1365-2486.2001.00424.x.
- NASA (2019). Monitoring Total Alkalinity & Ocean Acidification. Consultado a: 29/06/2019. Disponível em: <https://salinity.oceansciences.org/highlights03.htm>.
- Naser, M. N. (2000). Role of iron in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) nutrition: requirement, bioavailability, disease resistance and immune response. Dissertação para obtenção de grau de doutoramento em Filosofia. Universidade de Dalhousie, 282.
- Navarro, R.D., Navarro, F.K.S.P., Filho, J.T. S., Filho, O.P.R. (2010). Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. *Temas Livres*, 108–118.
- Njinkoué, J.M., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E.M., Samb, A. (2002). Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, **131**(3), 395–402. DOI: 10.1016/S1096-4959(01)00506-1.

- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) (2019). El Niño Theme Page. Pacific Marine Environmental Laboratory. Consultado a: 24-06-2019. Disponível em: <https://www.pmel.noaa.gov/elniño/faq>.
- Nogueira, C.G.N.S. (2017). *Perda de massa óssea e a sua relação com fraturas de fragilidade numa amostra esquelética portuguesa pertencente à Coleção de Esqueletos Identificados (CEI) da Universidade de Coimbra*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Evolução e Biologia humana. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 110p.
- Noone, K.J., Sumaila, U.R., Diaz, R.J. (2013). Managing ocean environments in a changing climate: Sustainability and Economic Perspectives, 372. ISBN: 978-0-12-407668-6.
- Norambuena, F., Rombenso, A., Turchini, G.M. (2016). Towards the optimization of performance of Atlantic salmon reared at different water temperatures via the manipulation of dietary ARA/EPA ratio. *Aquaculture*, **450**, 48–57. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.044.
- Oehlenschläger, J. (1997). Marine fish – A source for essential elements?! *In: Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. Elsevier Science B.V., Amsterdam*, 641-651.
- O’Gorman, P.A., Schneider, T. (2009). The physical basis for increases in precipitation extremes in simulations of 21st-century climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(35), 14773–14777. DOI: 10.1073/pnas.0907610106.
- Oliver, E.C.J., Perkins-Kirkpatrick, S.E., Holbrook, N.J., Bindoff, N.L., (2018). Antropogenic and natural influences on record 2016 marine heat waves. *American Meteorological Society*, **99**(1), 44-48. DOI: 10.1175/BAMS-D-17-0093.1.
- OMS (Organização Mundial de Saúde) (2003). Consultado a: 03/07/2019. Disponível em: http://www.who.int/nutrition/publications/pressrelease32_pt.pdf?ua=1.
- Özogul, Y., Özogul, F., Alagoz, S. (2007). Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chemistry*, **103**(1), 217–223. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.009.
- Pedrosa, L.D.F.C., Cozzolino, S.M.F. (1999). Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus. *Revista Nutrição*, **12**, 213-224.
- Perry, D.M., Redman, D.H., Widman, J.C., Meseck, S., King, A., Pereira, J.J. (2015). Effect of ocean acidification on growth and otolith condition of juvenile scup, *Stenotomus chrysops*. *Ecology and Evolution*, **5**(18), 4187–4196. DOI: 10.1002/ece3.1678.
- Pimentel, M.S., Faleiro, F., Dionísio, G., Repolho, T., Pousão-Ferreira, P., Machado, J., Rosa, R. (2014). Defective skeletogenesis and oversized otoliths in fish early stages in a changing ocean. *The Journal of Experimental Biology*, **217**, 2062-2070. DOI:10.1242/jeb.092635.
- Pörtner, H.O., Langenbuch, M., Michaelidis, B. (2005). Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, **110**(9), 1–15. DOI: 10.1029/2004JC002561.
- Pörtner, H.O., Bock, C., Knust, R., Lannig, G., Lucassen, M., Mark, F.C., Sartoris, F.J. (2008). Cod and climate in a latitudinal cline: Physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Climate Research*, **37**(2–3), 253–270. DOI: 10.3354/cr00766.
- Porter, J.R., Xie, L., Challinor, A.J., Cochrane, K., Howden, S.M., Iqbal, M.M., Lobell, D.B. (2014).

- Food security and food production systems. *In: Climate Change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: Global and sectoral aspects. Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, 485–533.
- Porteus, C.S., Hubbard, P.C., Webster, T.M.U., van Aerle, R., Canário, A.V.M., Santos, E. M., Wilson, R. W. (2018). Near-future CO₂ levels impair the olfactory system of a marine fish. *Nature Climate Change*, **8**, 737–743. DOI: 10.1038/s41558-018-0224-8.
- Querol, M.V.M., Querol, E., Gomes, N.N.A. (2002). Fator de condição gonadal, Índice Hepatosomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys Platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. *Jornal Iheringia, Série Zoológica*, **92**(3), 79-84. DOI: 10.1590/S0073-47212002000300008.
- Ramos Filho, M.M., Ramos, M.I.L., Hiane, P.A., Souza, E.M.T. (2008). Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **28**(2), 361–365. DOI: 10.1590/s0101-20612008000200014.
- Rasoarahona, J.R.E., Barnathan, G., Bianchini, J.P., Gaydou, E.M. (2005). Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and *Tilapia rendalli*) from Madagascar. *Food Chemistry*, **91**(4), 683–694. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.07.001.
- REA (2018). *Solo e Biodiversidade - Produção em aquicultura*. Consultado a 20/06/2019. Disponível em <https://rea.apambiente.pt/content/produ%C3%A7%C3%A3o-em-aquicultura>.
- Reilly, C. (2004). The Nutritional Trace Metals. *Blackwell Publishing Ltd*, Oxford, 253. ISBN: 1-4051-1040-6.
- Ricker, W.E. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin - Fisheries Research Board of Canada*, **191**, 1–382.
- Riebesell, U., Schulz, K.Z., Bellerby, R.G., Botros, M., Fritsche, P., Meyerhöfer, M., Neill C, Nondal, G., Oschlies, A., Wohlers, J., Zöllner, E. (2007). Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean, *Nature*, **450**(7169), 545–548. DOI: 10.1038/nature06267.
- Roche, H., Jouanneteau, J., Peres, G. (1993). Effects of adaption to different salinities on the lipids of various tissues in sea dace (*Dicentrarchus labrax* fishes). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **74**, 325–330.
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Cordero, M.L., Alarcón, F. J. (2015). Tissue composition, blood biochemistry and histology of digestive organs in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles fed diets containing different plant protein ingredients. *Aquaculture Nutrition*, **21**(6), 767–779. DOI: 10.1111/anu.12207.
- Roemmich, D., John Gould, W., Gilson, J. (2012). 135 years of global ocean warming between the Challenger expedition and the Argo Programme. *Nature Climate Change*, **2**(6), 425-428. DOI: 10.1038/nclimate1461.
- Rosa, R., Marques, A., Nunes, M.L. (2012). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **4**, 163–177. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2012.01071.x.
- Rosa, R., Rummer, J.L., Munday, P.L. (2017). Biological responses of sharks to ocean acidification. *Biology Letters*, **13**(3), 1-7. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0796.
- Ruiter, A., 1995. Contaminants in fish. *In: Fish and fishery products composition, nutritive properties and stability. Centre for Agriculture and bioscience International*, 261-285. ISBN: 978-0851989273.

- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Rios, A.F. (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, **305**(5682), 367–371. DOI: 10.1126/science.1097403.
- Sanches, E.G., Silva, F.C., Leite, J.R., Silva, P.K.A., Kerber, C.E., Santos, P.A. (2014). A incorporação de óleo de peixe na dieta pode melhorar o desempenho da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*? *Boletim Institucional de Pesca*, **40**(2), 147 – 155.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, **77**, 187–194. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00059-3.
- Sarazin, G., Michard, G., Prevot, F. (1999). A rapid and accurate spectroscopic method for alkalinity measurements in seawater samples. *Water Research*, **33**, 290-294.
- Saunders, C., Ramalho, A., Padilha, P.C., Barbosa, C.C., Leal, M.C. (2007). Investigação da cegueira noturna no grupo materno-infantil - Uma revisão histórica. *Revista de Nutrição*, **20**(1), 95-105.
- Schellnhuber, H.J., Cramer, W., Nakicenovic, N., Wigley, T., Yohe, G. (2006). Avoiding Dangerous Climate Change, *Cambridge University Press*. Capítulo 8, 79-84. ISBN: 13 978-0-521-86471-8.
- Scherr, C., Gagliardi, A.C.M., Miname, M.H., Santos, R.D. (2014). Fatty Acid and Cholesterol Concentrations in Usually Consumed Fish in Brazil. *Instituto do Coração e do Diabetes*, **104**(2), 152-158. DOI: 10.5935/abc.20140176.
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W. (2007). Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin*, **54**(12), 1845–1856. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2007.09.020.
- Shaw, R.W., Kent, M.L., Adamson, M.L. (2000). Innate susceptibility differences in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* to Loma salmonae (Microsporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **43**(1), 49–53. DOI: 10.3354/dao04304.
- Shrivastava, J., Ndugwa, M., Caneos, W., De Boeck, G. (2019). Physiological trade-offs, acid base balance and ion-osmoregulatory plasticity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles under complex scenarios of salinity variation, ocean acidification and high ammonia challenge. *Aquatic Toxicology*, **212**, 54–69. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.04.024.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**(8), 365–379. DOI: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.
- Simopoulos, A.P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, **8**(3), 128. DOI: 10.3390/nu8030128.
- Skalli, A., Robin, J.H., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Person-Le Ruyet, J. (2006). Impact of essential fatty acid deficiency and temperature on tissues' fatty acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **255**(1-4), 223–232. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.006.
- Solomons, N.W. (1993). Zinc. In: Encyclopedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Academic Press, 4980-4994. ISBN: 9780080917917.
- Spencer, H., Lesniak, M., Gatz, C.A., Osis, D., Lender, M. (1980). Magnesium absorption and metabolism in patients with chronic renal failure and in patients with normal renal function. *Gastroenterology*, **79**(1), 26–34.

- Stiasny, M.H., Mittermayer, F.H., Sswat, M., Voss, R., Jutfelt, F., Chierici, M., Puvanendran, V., Mortensen, A., Reusch, T.B.H., Clemmesen, C. (2016). Ocean Acidification Effects on Atlantic Cod Larval Survival and Recruitment to the Fished Population. *PLoS ONE*, **11**(8), 155-448. DOI: 10.1371/journal.pone.0155448.
- Strobel, A., Bennecke, S., Leo, E., Mintenbeck, K., Portner, H.O., Mark, F.C. (2012). Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and $p\text{CO}_2$. *Frontiers in Zoology*, **9**(1), 28. DOI: 10.1186/1742-9994-9-28.
- Sumaila, U.R., Cheung, W.W.L., Lam, V.W.Y., Pauly, D., Herrick, S. (2011). Climate change impacts on the biophysics and economics of world fisheries. *Nature Climate Change*, **1**(9), 449–456. DOI: 10.1038/nclimate1301.
- Sun, L., Chen, H. (2014). Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, **426–427**, 172–180. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.001.
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I.G., Lobo, C., Balebona, M. C., Moriño, M. A. (2010). Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Following Probiotic Administration. *Microbial Ecology*, **60**(2), 310–319. DOI: 10.1007/s00248-010-9680-z.
- Tate, R.D., Benkendorff, K., Ab Lah, R., Kelaher, B.P. (2017). Ocean acidification and warming impacts the nutritional properties of the predatory whelk, *Dicathais orbita*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **493**, 7–13. DOI: 10.1016/j.jembe.2017.03.006.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Moraes, F.R. (2000). Relação hepatosomática e esplenosomática em peixes teleosteos de cultivo intensivo. *Revista brasileira de Zoologia*, **17**(1), 273 - 281. DOI: 10.1590/S0101-81752000000100024.
- Tidwell, J.H., Allan, G.L. (2001). Fish as food: Aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Reports*, **2**(11), 958–963. DOI: 10.1093/embo-reports/kve236
- Tognon, A.L. (2012). *Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências (área Química). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 128p.
- Trindade, C.E.P. (2005). Importância dos minerais na alimentação do pré-termo extremo. *Jornal de Pediatria*, **81**(1), 43-51.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in Teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, **11**(2), 107-184. DOI: 10.1080/713610925.
- Tropea, C., Stumpf, L., Lopez Greco, L.S. (2015). Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). *PLoS One*, **10**(3), 119-468. DOI: 10.1371/journal.pone.0119468.
- UCAR (2019). The Carbon Cycle. Consultado a: 03/07/2019. Disponível em: <https://scied.ucar.edu/carbon-cycle>.
- Ulbricht, T. L., Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease, seven dietary factors. *Lancet*, **338**(8773), 985–992. DOI: 10.1016/0140-6736(91)91846-m.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M., Szatkowska, U. (2011). Marine and farmed fish

- in the Polish market: Comparison of the nutritional value. *Food Chemistry*, **126**(1), 78–84. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.080.
- Valles-Regino, R., Tate, R., Kelaher, B., Savins, D., Dowell, A., Benkendorff, K. (2015). Ocean warming and CO₂-induced acidification impact the lipid content of a marine predatory gastropod. *Marine Drugs*, **13**(10), 6019–6037. DOI: 10.3390/md13106019.
- Venugopal, V., Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, **12**(2), 175–197. DOI: 10.1080/87559129609541074.
- VijayaVenkataRaman, S., Iniyan, S., Goic, R. (2012). A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(1), 878–897. DOI:10.1016/j.rser.2011.09.009.
- Vila Nova, C.M.V.M., Godoy, H.T., Luiz, M.L. (2005). Composição Química, teor de colesterol e caracterização de lipídios totais da Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e Pargo (*Lutjanus purpureus*). *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **25**(3), 430-436. DOI: 10.1590/S0101-20612005000300007.
- Viles, P., Silverman, J. (1949). Determination of starch and cellulose with anthrone. *Journal of Analytical Chemistry*, **21**(8), 950–953. DOI: 10.1021/ac60032a019.
- Villanueva, J.L.R., Alonso, J.B.P. (2014). Cuadernos de acuicultura – Cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, 47. ISBN: 978-84-939800-5-4.
- Walker, C.F., Kordas, K., Stoltzfus, R.J., Black, R.E. (2005). Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, **82**(1), 5–12. DOI: 10.1093/ajcn.82.1.5.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**, 389. DOI: 10.1038/416389a.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, **151**, 185-207.
- Wedemeyer, G.A. (1997). Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Cambridge University Press, 35–71.
- Widlansky, M.J., Storlazzi, C.D. (2019). Tropical Cyclone Projections: Changing Climate Threats for Pacific Island Defense Installations. *Weather, Climate, and Society*, **11**(1), 3-15. DOI: 10.1175/WCAS-D-17-0112.1.
- Williams, M.H. (2005). Dietary Supplements and Sports Performance: Minerals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **2**(1), 43-49. DOI: 10.1186/1550-2783-2-1-43.
- Windisch, H.S., Kathöver, R., Pörtner, H.O., Frickenhaus, S., Lucassen, M. (2011). Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **301**(5), 1453–1466. DOI: 10.1152/ajpregu.00158.2011.
- Yoo, G.Y., Lee, J.Y. (2016). The effect of feeding frequency, water temperature, and stocking density on the growth of river puffer *Takifugu obscurus* reared in a zero-exchange water system. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **19**, 23. DOI 10.1186/s41240-016-0024-x.

- Yuyama, L.K.O., Aguiar, J.P.L., Yuyama, K., Macedo, S.H.M., Fávaro, D.I.T., Afonso, C., Vasconcelos, M.B.A. (1999). Determinação de elementos essenciais e não essenciais em palmito de pupunheira. *Horticultura Brasileira*, **17**(2), 91-95. DOI: 10.1590/S0102-05361999000200003.
- Zeebe, R.E. (2012). History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric CO₂, and Ocean Acidification. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **40**(1), 141–165. DOI: 10.1146/annurev-earth-042711-105521.

ANEXOS

Anexo I – Formulação e matérias-primas da ração administrada ao linguado juvenil.

Ingredientes	%
Farinha de peixe LT70¹	45,0
Farinha de lula²	7,5
Concentrado de proteína de soja³	8,0
Concentrado de proteína de ervilha⁴	2,5
Glúten de trigo⁵	10,0
Farinha de trigo⁶	14,3
Óleo de peixe⁷	10,5
Pré-mistura de vitaminas e minerais⁸	1,0
Antioxidante⁹	0,2
Fosfato monocálcio¹⁰	1,0
Óxido de ítrio¹¹	0,02
Humidade	8,0
Proteína bruta	58,0
Gordura	14,0
Cinza	8,7

¹ NORVIK LT70: 71,9% proteína bruta (PB), 6,8% gordura (G), Sopropêche, França ;

² Farinha de lula sem vísceras: 83% PB, 4% G, Sopropêche, França;

³ Soycomil P: 63% PB, 0,8% G, ADM, Holanda;

⁴ LYSAMINE GPS: 78,1% PB, 0,9% G, ROQUETTE Frères, França;

⁵ VITAL: 83,7% PB, 1,6% G, ROQUETTE Frères, França ;

⁶ Glúten de trigo: 10,2% PB; 1,2% G, Casa Lanchinha, Portugal;

⁷ Sopropêche, França;

⁸ PREMIX Lda, Portugal: Vitaminas (IU ou mg/kg de alimento): Acetato de DL- α -tocoferol, 100 mg; Menadiona-bissulfito de sódio, 25mg; Acetato de retinol, 20000 IU; DL-colecalciferol, 2000 IU; tiamina, 30mg; riboflavina, 30mg; piridoxina, 20 mg; Cianocobalamina, 0,1 mg; Ácido nicotínico, 200 mg; Ácido fólico, 15 mg; Ácido ascórbico, 500 mg; Inositol, 500 mg; Biotina, 3 mg; Pantotenato de cálcio, 100 mg; Cloreto de colina, 1000 mg; Betaína, 500 mg; Minerais (g ou mg/kg de alimento): Sulfato de cobre, 9 mg; Sulfato ferro (II), 6 mg; Iodeto de potássio, 0,5 mg; Óxido de manganês, 9,6 mg; Selenito de sódio, 0,01 mg; Sulfato de zinco, 7,5 mg; Cloreto de sódio, 400 mg; Excipiente de farelo de trigo;

⁹ VERDILOX, Kemin Europe NV, Bélgica;

¹⁰ ALIPHOS MONOCAL, 22,7% P, ALIPHOS, Bélgica;

¹¹ Sigma Aldrich, USA.

Anexo II - Parâmetros físicos e químicos da água dos diferentes tratamentos (média±desvio padrão) a que o linguado juvenil esteve exposto ao longo de 61 dias. Abreviaturas: Controlo - temperatura de referência e condições de pH (isto é, T = 19 °C e pH = 8,0 unidades); Acidificação simulada (isto é, pH = 7,7 unidades); Aquecimento simulado (isto é, T = 23 °C); Acidificação + Aquecimento simulados (isto é, T = 23 °C e pH = 7,7 unidades); AT - alcalinidade total; $p\text{CO}_2$ - pressão parcial de CO_2 ; TCO_2 - concentração total de CO_2 ; HCO_3^- - bicarbonato; ΩAra - estado de saturação da aragonite; ΩCal - estado de saturação da calcite.

	Controlo	Acidificação	Aquecimento	Acidificação + Aquecimento
Temperatura (°C)	18,9±0,4	19,1±0,4	23,0±0,3	23,0±0,3
Salinidade	35,3±0,4	35,2±0,5	35,7±0,6	35,5±0,6
pH	8,02±0,07	7,71±0,06	8,01±0,06	7,66±0,06
AT (μmol/kg)	2236,2±226,2	2073,8±258,7	2045,3±221,7	1966,0±264,4
$p\text{CO}_2$ (μatm)	457,3±69,4	1036,8±158,0	392,1±56,4	1039,1±174,8
TCO_2 (μmol/kg)	2011,2±202,1	1986,4±245,8	1788,3±180,6	1868,5±236,6
HCO_3^- (μmol/kg)	1835,0±179,5	1875,4±231,2	1601,3±149,6	1756,2±216,0
ΩAra	2,50±0,39	1,22±0,30	2,75±0,56	1,30±0,44
ΩCal	3,86±0,60	1,88±0,46	4,20±0,86	1,98±0,67

Anexo III- Concentração de ácidos gordos presentes na ração (valores apresentados em mg ácidos gordos por 100 g, Média±desvio padrão).

Ácidos gordos	Ração Linguado
SFA	
C12:0	48,3 ± 1,4
C13:0	8,7 ± 0,5
C14:0	1638,5 ± 5,0
C15:0	94,2 ± 0,7
C16:0	6337,5 ± 12,0
C17:0	85,3 ± 1,4
C18:0	989,6 ± 0,1
C20:0	13,0 ± 0,8
C22:0	62,0 ± 2,5
C23:0	20,0 ± 1,5
C24:0	34,3 ± 1,0
MUFA	
C14:1 n-5	3,9 ± 0,3
C16:1 n-7	714,5 ± 3,0
C18:1 n-9 t	210,5 ± 6,5
C18:1 n-9 c	2591,0 ± 6,0
C20:1n-9	142,6 ± 1,4
C22:1 n-9	61,9 ± 0,4
C24:1 n-9	88,5 ± 3,0
PUFA	
C18:2 n-6 t	8,2 ± 0,5
C18:2 n-6 c	2754,0 ± 9,5
C18:3 n-3	392,4 ± 0,9
C18:3 n-6	61,5 ± 1,3
C20:3 n-3	76,2 ± 1,5
C20:3 n-6	48,0 ± 2,0
C20:4 n-6	11,4 ± 0,8
C20:5 n-3	873,0 ± 1,9
C22:6 n-3	521,0 ± 18,0
ΣSFA	9330,6
ΣMUFA	3813,2
ΣPUFA	4745,0
Σω3	1862,3
Σω6	2874,8